

Isolierung und Charakterisierung der biologischen Aktivität von nativem BMP-3

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität

2008

von Alexander Kühnemund
geboren am 15.05.1978 in Cottbus

Abkürzungsverzeichnis

ActR	Activin-Receptor
AU	Arbitrary-Unit
bHLH	Basischer Helix-Loop-Helix
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
BMPR	Bone-Morphogenetic-Protein-Rezeptor
BRE	BMP- Response-Element
cDNA	Complementary-Desoxyribonucleid-Acid
DMEM	Dulbeccos-Modified-Eagle-Medium
eBMPR1A	Extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors
ERK	Extracellular Signal-Regulated-Kinase
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent-Assay
FCS	Fetal-Bovine-Serum
GDF	Growth-Differentiation-Factor
HECT	Homologous to E6-AP C-Terminus
ID	Inhibitor of Differentiation
kDa	Kilo Dalton
NHS	N-Hydroxysuccinimide
MAP	Mitogen-Activated-Protein
MIS	Mullerian-Inhibiting-Substance
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
RNA	Ribonucleinacid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction
SIP	Smad-Interacting-Protein
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SMAD	Signaling Substrate for BMP-Receptor-Kinase, related to Drosophila Mad Gene
Smurf	Smad-Ubiquitin-Regulatory-Factor
TAE	Tris-Base-Acidic acid-EDTA-Buffer
TAK	TGF- β -Activated-Kinase
TGF- β	Transforming Growth-Factor-beta

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
uPA	Plasminogenactivator from Urokinase-Typ

Inhaltsverzeichnis

1.0.	Einleitung.....	1
1.1.	Das Mammakarzinom.....	1
1.2.	Die Knochenmorphogenesefaktoren.....	3
1.3.	Aufbau und Struktur der BMPs.....	4
1.3.1.	Struktur des BMP-3.	6
1.3.2.	BMP-3- Der aktuelle Wissensstand.....	8
1.4.	BMP-Rezeptoren.....	9
1.5.	Die Signaltransduktionskaskade.....	11
1.5.1.	Regulation der BMP-Signaltransduktion.....	15
1.6.	BMP- Zielgene.....	17
1.7.	BMP in Tumoren.....	18
1.8.	Zielstellung.....	19
2.0.	Material und Methoden.....	20
2.1.	Zelllinien.....	20
2.2.	Zellkultivierung.....	20
2.3.	Immunoaffinitätschromatographie.....	21
2.3.1.	Gewinnung des Kulturüberstandes von SK-BR-3-Zellen.....	21
2.3.2.	Aufkonzentrierung des Überstandes.....	22
2.3.3.	Trennung der Proteine.....	22
2.3.4.	Immunoaffinitätschromatographie mit NHS-Sepharose.....	23
2.4.	Immunpräzipitation.....	25
2.5.	Deglykosylierung von Proteinen.....	25
2.6.	Proteinanalyse.....	26
2.6.1.	Proteinisolierung	26
2.6.2.	Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	27
2.6.3.	Material zur Auftrennung der Proteine.....	27
2.6.4.	Western-Blot.....	29
2.6.5.	Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern.....	30
2.7.	Alkalischer-Phosphatase-Assay.....	31
2.7.1.	Kultivierung der C2C12-Zellen.....	32
2.7.2.	Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität.....	33
2.8.	RNA-Isolierung.....	34

2.8.1.	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	35
2.9.	cDNA-Synthese.....	35
2.10.	PCR (Polymerasekettenreaktion)	37
2.11.	Auftrennung der PCR-Produkte.....	38
2.11.1.	Herstellung des Agarose-Gels und Probenauftrag.....	38
2.12.	Gel-Lauf und -auswertung.....	39
3.0.	Ergebnisse	40
3.1.	Nachweis der BMP-3-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien.....	40
3.2.	Nachweis von BMP-3-Protein.....	41
3.3.	Bestimmung der optimalen BMP-3-Protein-Quelle.....	42
3.3.1.	Vergleich Zellkulturüberstand mit Zelllysat.....	42
3.4.	Etablierung und Optimierung der Aufreinigung von BMP-3 aus dem Zellkulturüberstand.....	45
3.4.1.	Technisch: Antikörper und Säulenverfahren.....	45
3.4.2.	Zellkultur: Bestimmung der optimalen Zelldichte und Wachstumsdauer.....	49
3.5.	Charakterisierung des gewonnenen BMP-3 über die biologische Aktivität.....	54
3.5.1.	Deglykosylierung des gewonnenen Eluats.....	54
3.5.2.	Proteinaufreinigung mit Milliporefilter®.....	56
3.5.3.	Protein-A-Sepharose.....	57
3.5.4.	Alkalische Phosphatase-Inkubationsversuche.....	60
3.5.4.1.	Inkubation mit SK-BR-3-konditioniertem Medium.....	62
3.5.4.2.	Inkubation mit Säulen-Eluat aus der Immunoaffinitätschromatographie.. ..	62
3.5.4.3.	Inkubation von C2C12-Zellen mit BMP (E.coli) und Eluat aus Protein-A-Sepharose-Aufreinigung.....	64
4.0.	Diskussion.....	67
5.0.	Literaturverzeichnis.....	78
6.0.	Abbildungsverzeichnis.....	91

7.0.	Tabellenverzeichnis.....	93
8.0.	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

Zusammenfassung

Bone Morphogenetic Protein-3 (BMP-3) gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, deren Mitglieder eine entscheidende Rolle in den Wachstums- und Differenzierungsprozessen der eukaryoten Zellen spielen. Als Zytokine wirken sie als Signale für die Zell-Zell-Kommunikation. Sie fungieren während der Induktion des Knochenwachstums sowie bei der Regulation des Knochenmetabolismus. Weiterhin spielen sie als Morphogene eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung auch der Wirbeltiere. Ihre feinabgestimmte Regulierung bewirkt, dass sie in einer spezifischen zeit- und konzentrationsabhängigen Art und Weise agieren. Es ist bekannt, dass Defekte in den Signalwegen der BMPs zu erheblichen Entwicklungsstörungen führen können. Im adulten Organismus kann es dabei auch zur Entstehung von Tumoren kommen.

Für die TGF- β -Superfamile, zu denen die BMPs gehören, ist eine Großzahl an Mitgliedern bekannt. Dabei ist bei weitem nicht für alle die biologische Funktion geklärt. Den BMPs wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren, unter anderen des Mammakarzinoms, zugeschrieben.

BMP-3 ist ein Knochenmorphogenesefaktor, für den es bisher kaum Untersuchungen hinsichtlich der biologischen Funktion gibt, der aber aufgrund seiner Signal-Übertragung als "Außenseiter" in der BMP-Familie betrachtet wird. Die Frage, die sich sicher nicht Shakespeare, aber Daluiski im Jahr 2001 stellte, „BMP-3, to be or not to be a BMP“, ist bisher noch nicht beantwortet. Man geht davon aus, dass BMP-3 letztendlich eine essentielle Rolle als Modulator der osteogen aktiven BMPs spielt (Bahamonde und Lyons 2001). Der Mechanismus ist bisher noch nicht eindeutig belegt. Zum einen vermutet man, dass BMP-3 ein direkter Rezeptor-Antagonist ist und so die Signalkaskade der anderen BMPs blockiert. Ein anderer Weg, der diskutiert wird, ist die Heterodimerbildung mit anderen BMPs und Activinen, um so dominant negative Liganden zu bilden (Hino et al. 2003, Gamer et al. 2005). Beides erscheint möglich.

Es stellt sich somit die Frage, ob BMP-3 im engerem Zusammenhang mit der Tumorentstehung und -entwicklung stehen könnte. Um die biologische Funktion des BMP-3 untersuchen zu können, isolierten wir natives BMP-3.

Die Funktion des BMP-3 wird über die Möglichkeit der Regulation bzw. Inhibition der anderen BMPs definiert. Somit ist es nötig, eine biologische Funktion mit Hilfe von anderen BMPs darzustellen. Von BMP-2 ist bekannt, dass es die Entwicklung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten fördert. Dies geschieht über eine Aktivierung des ALK-1 Rezeptors. Des Weiteren ist in diesem Rahmen eine Induktion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität zu verzeichnen (Thies et al. 1992, Katagiri et al. 1994, Engstrand et al. 2000). Die BMP-induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase wurde zum Nachweis für BMP-induzierte Osteoblastendifferenzierung benutzt (Fujii et al. 1999).

Die Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde durch rekombinantes BMP-2 induziert und beobachtet, welche Effekte in Kombination mit dem gewonnenen BMP-3 zu verzeichnen sind. In allen Experimenten ließ sich ein hemmender Effekt des gewonnen BMP-3 auf die BMP-2-Wirkung nachweisen.

Der genaue Mechanismus des hemmenden Einflusses von BMP-3 ist unbekannt. Man vermutet, dass die Effekte über die bekannte Aktivierung des TGF- β /Activin-Signalweges durch BMP-3 ausgeübt werden könnten.

Wir benötigen ein tiefgreifenderes Verständnis der Rolle von BMP-3, um festzustellen, ob dies therapeutisch von Nutzen sein könnte.

1.0. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom stellt weltweit eines der häufigsten und gravierendsten frauenspezifischen Gesundheitsprobleme sowohl hinsichtlich der Inzidenz als auch der Mortalität dar. Die Zahl an geschätzten Neuerkrankungen lag für Deutschland für das Jahr 1998 bei 46.952 und für das Jahr 2000 bei 47.517, die Zahl der Todesfälle wird auf 19.000 geschätzt (Deutschland 2002).

Weltweit treten ca. eine Million Neuerkrankungen pro Jahr auf und die geschätzte Zahl an Todesfällen liegt bei 500.000 Patientinnen. Dabei ist die Verteilung der Erkrankung in den einzelnen Regionen bzw. Ländern sehr unterschiedlich. Sie liegt mit ca. 86 Fällen pro 100.000 Einwohnern in Nordamerika am höchsten und mit ca. 11 Fällen pro 100.000 Einwohnern im asiatischen Raum wesentlich niedriger. Mit ca. unwesentlich unterhalb der in den USA (Parkin et al. 1999).

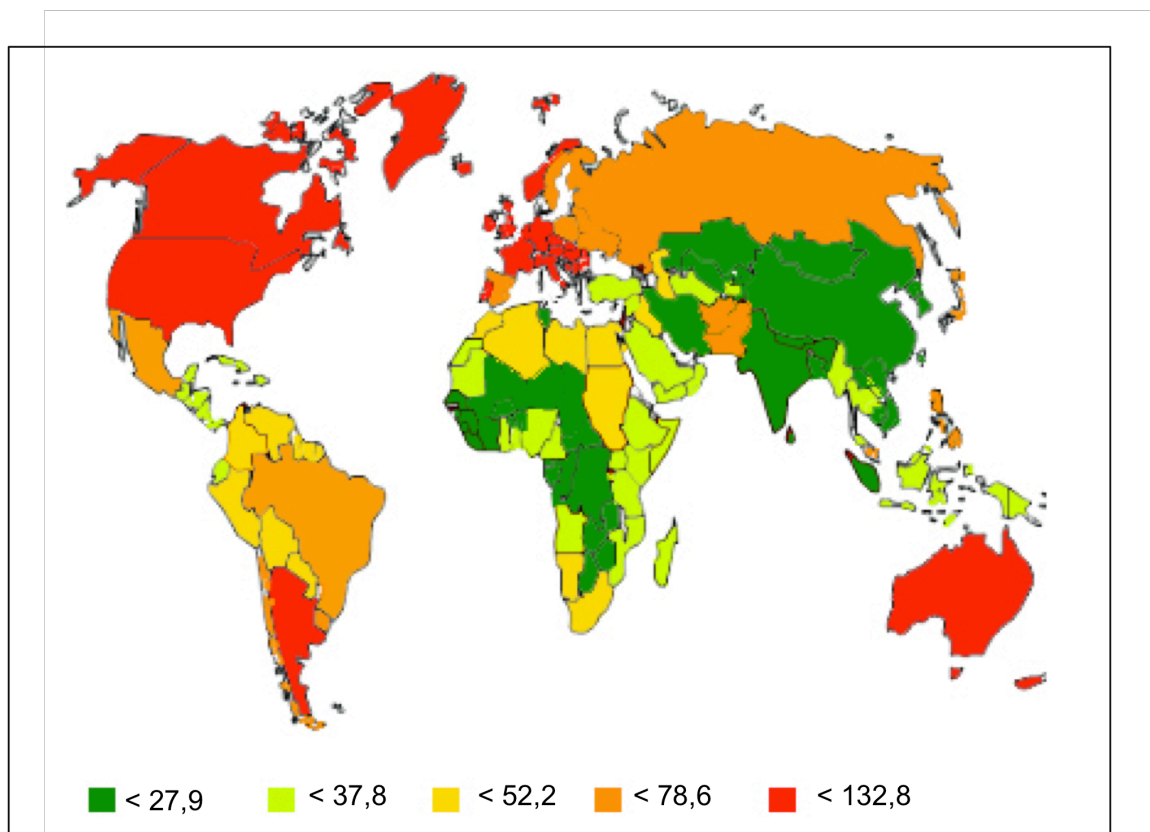


Abb. 1.1. Inzidenz des Mammakarzinoms weltweit. Es zeigt sich ein erhöhtes Risiko in den Industrieländern

In einer Reihe von epidemiologischen Studien wurden eine Vielzahl von exogenen und endogenen Faktoren beschrieben, von denen die Inzidenz des Mammakarzinoms abhängt. Der wichtigste Faktor ist das Alter. Die Inzidenz des

Brustkrebses verdoppelt sich alle 10 Jahre bis zur Menopause. Danach ist zwar immer noch ein Anstieg in der Inzidenz zu verzeichnen, aber mit deutlich niedrigeren Steigerungsraten. Zudem werden in einigen Ländern, wie z.B. Japan, zwei Erkrankungsgipfel beschrieben. Der erste liegt bei ca. 43 Jahren, der zweite bei ca. 60 Jahren (McPherson et al. 2000). Weitere Faktoren, die das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen, stellen eine frühe Menarche und eine späte Menopause, eine späte Erstgeburt bzw. der Status als Nullipara, das Leben in einem Industrieland, fettreiche Ernährung (besonders mit gesättigten Fetten), ein Gewicht mit einem BMI von über 35 postmenopausal sowie benigne Brusterkrankungen dar. Das erhöhte Risiko in den Industrieländern zeigt, dass auch Stress und Umweltfaktoren ernstzunehmende Risikofaktoren bei der Entstehung von Mammakarzinomen zu sein scheinen (McPherson et al. 2000).

Zusätzlich spielen genetische Faktoren bei der Inzidenz des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle. Anamnestisch konnten bei etwa 12% der Erkrankten eine erstgradige und bei ca. einem Prozent zwei oder mehrere Verwandte, die ebenfalls an einem Mammakarzinom erkrankt waren, eruiert werden (Beral et al. 2001). Eine wahrscheinlich untergeordnete Rolle spielt hierbei die monogene Form der Vererbung des Brustkrebses mittels der BRCA1- und BRCA2-Gene. Hier konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutationen über einen autosomal dominanten Erbgang direkt im Zusammenhang mit der Genese von Mamma- und Ovarialkarzinomen stehen. Schätzungsweise lassen sich weniger als 5% aller Mammakarzinome auf diese Mutation zurückführen (Group 2000).

Auch Männer können an Brustkrebs erkranken. Der Anteil ist jedoch extrem gering im Vergleich zum Brustkrebs bei Frauen. Er liegt bei unter ein Prozent der Brustkrebsfälle. Trotzdem ist auch hier innerhalb der letzten 25 Jahre ein Anstieg von 0,86 auf 1,08 Fälle/100.000 Männer zu verzeichnen. Das Karzinom wird in der Regel später entdeckt als bei der Frau, da die wenigsten Männer bei einer einseitigen Brustvergrößerung mit der Möglichkeit einer bösartigen Neubildung rechnen (Giordano et al. 2004).

Bei etwa 50% der Patientinnen bestehen bei der Primärdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen. Dies geht mit einer Verschlechterung der Prognose einher. Um ein genaueres Bild vom Ausmaß der Erkrankung zu erhalten, berücksichtigt man noch weitere Faktoren. Hierzu zählt das Grading, der histologische Typ, der Steroid-

Hormonrezeptorstatus (Östrogen und Progesteron) und der Mitoseindex bzw. die Proliferationskinetik des Tumors.

Von den prognostischen Faktoren sind die prädiktiven Faktoren zu unterscheiden. Diese bezeichnen Merkmale der Tumorerkrankung, die helfen, die Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolges vorherzusagen. Somit tragen diese Faktoren zu einer selektiven und risikoadaptierten Therapiewahl bei. Faktoren, die heutzutage evidenzbasiert eingesetzt werden, sind der Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus hinsichtlich der Frage einer endokrin adressierten Therapie, der Menopausenstatus hinsichtlich der Frage einer ovariellen Ablation und der HER2/neu Status hinsichtlich der Frage einer Trastuzumab (Herceptin®)-Therapie.

Um in der Zukunft noch individuellere Therapiekonzepte verfolgen zu können, werden weitere tumorbiologische Prognosefaktoren gesucht. Hierbei werden weit über 100 mögliche Faktoren für den klinischen Einsatz diskutiert. Leider sind nur wenige für den routinemäßigen Einsatz geeignet. Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPa und sein Inhibitor PAI-1 sind die ersten beiden Faktoren, die mittels ELISA gut erfasst und quantifizierbar reproduziert werden können. Beide Faktoren spielen bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine Schlüsselrolle. Patientinnen mit einem niedrigen Level beider Faktoren haben eine deutlich bessere Prognose in Bezug auf rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben (Beral et al. 2001). Weitere tumorbiologische Faktoren, die momentan noch Gegenstand der Forschung sind, aber in naher Zukunft eine prognostische und prädiktive Rolle in der klinischen Routine spielen könnten, sind das Tumorsuppressorgen p53, verschiedene Proliferationsmarker wie das Thymidin-Labeling, Ki-67/MIB1 oder DNA-Ploidie, Invasionsfaktoren wie Cathepsin B oder Lamininrezeptoren und Apoptosemarker wie bcl-2.

Der erste Nachweis von Bone-Morphogenetic-Proteins (BMPs) im Brustgewebe gelang Phippard et al. 1996. Sie beschrieben das Vorkommen von BMPs in Epithelzellen, in der fetalen und postnatalen Brustdrüse.

1.2. Die Knochenmorphogenesefaktoren

Im Jahr 1965 zeigte Marshall Urist, dass durch die Implantation von demineralisiertem allogenen Knochenmaterial die Bildung von Knochengewebe in Muskulatur und subkutanem Gewebe induziert werden kann. Da aufgrund der

Demineralisation die Knochenmatrix keine funktionsfähigen Osteoblasten besitzt und der osteoinduktive Effekt durch Hitze einwirkung zerstört werden konnte, führte er das osteoinduktive Potential der Knochenmatrix auf bisher unbekannte Moleküle zurück. Er bezeichnete diese als Bone-Morphogenetic-Protein (Urist 1965).

Die weitere Auftrennung und Charakterisierung der Knochenmatrix führte zu einer Proteinfraction von ca. 30.000 Dalton (Wang et al. 1988, Wozney et al. 1988, Wang et al. 1990, Sampath et al. 1992). Durch Aufschlüsselung der Aminosäuresequenz und der kodierenden Gene konnten mehrere osteoinduktive Proteine gefunden werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten mit TGF- β wurden sie der TGF- β -Superfamilie zugeordnet. Die TGF- β -Superfamilie ist eine Familie von Wachstumsfaktoren mit evolutionär konservierter Polypeptidstruktur und ist innerhalb der letzten Jahre kontinuierlich um Mitglieder erweitert worden. Im Moment umfasst die Gruppe ca. 45 verschiedene Gene. Die Mitglieder dieser Gruppe regulieren und kontrollieren eine Vielzahl von biologischen Antworten. Veränderungen in ihren Signalwegen sind verantwortlich für eine Vielzahl von Krankheiten. Die größte Untergruppe der TGF- β -Familie stellen die BMPs dar. Derzeit sind 15 von ihnen beschrieben. Der Name BMP ist etwas irreführend, denn weitere Untersuchungen der BMPs nach ihrer Entdeckung zeigten, dass sie nicht nur eine Rolle in der Knochenentwicklung spielen, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben vorkommen und wie die anderen Mitglieder der TGF- β -Familie für die Regulation diverser Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Morphogenese verantwortlich sind (Hogan 1996). Weitere Gene, die zur TGF- β -Familie gezählt werden, stellen die Activine/Inhibine, die Mullerian-Inhibiting-Substance und die GDFs (Growth- and Differentiation-Factors) dar.

1.3. Aufbau und Struktur der BMPs

Die verschiedenen Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind sich von ihrer molekularen Struktur her sehr ähnlich. Sie werden als Vorläufermolekül synthetisiert, welches aus dem aminoterminalen Signalpeptid, dem Vorläuferprotein und dem carboxyterminalen maturen Protein besteht. Das Präpropeptid besitzt am aminoterminalen Ende eine Signalsequenz, mit deren Hilfe es an die Zelloberfläche gelangt (Abb. 1.2.). Das Vorläuferprotein mit dem reifen Protein wird dimerisiert und glykosyliert. Anschließend wird das Vorläuferprotein proteolytisch während des

Sekretionsvorganges abgespalten. Dabei ist das Vorläuferprotein für das Erreichen der korrekten Struktur notwendig.

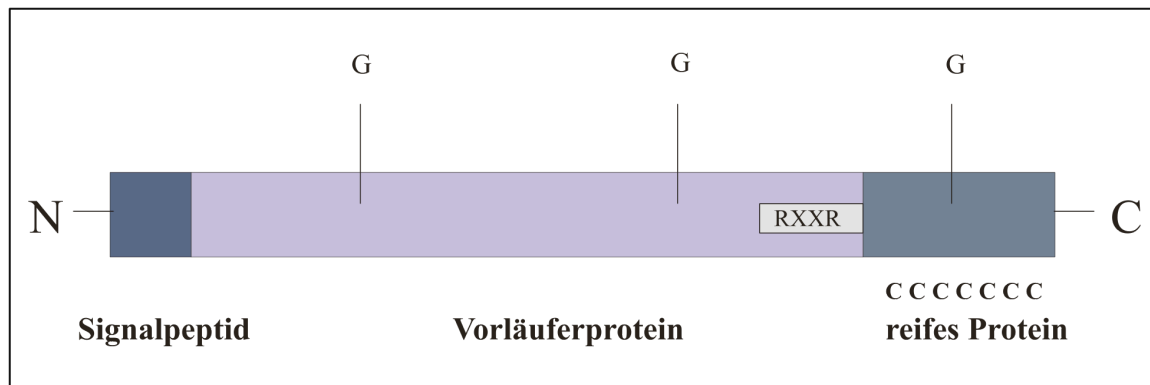
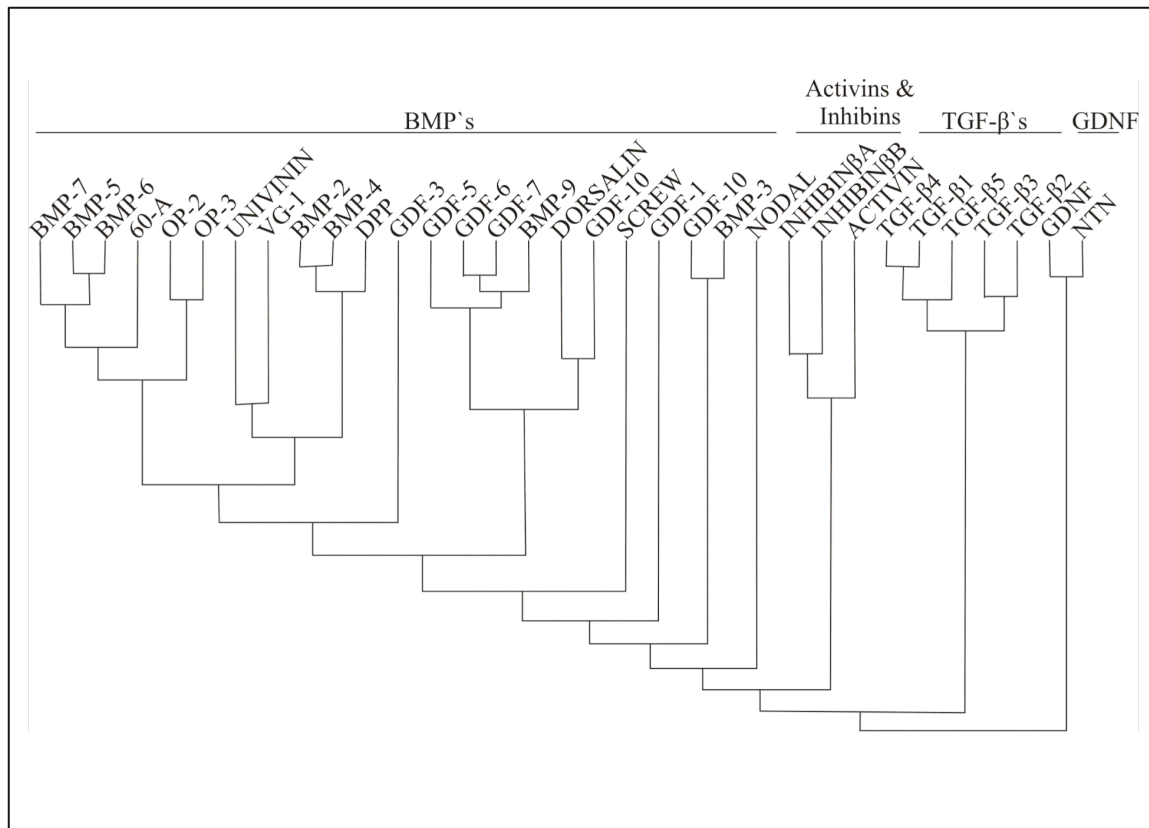


Abb. 1.2. Aufbau der Proteine der TGF- β Superfamilie. N: N- terminales Ende , C: C- terminales Ende, G: N-Glykosylierung, c: Cysteinreste, RXXR: Spaltregion

Das strukturelle Kennzeichen der TGF- β -Familie ist ein hochkonserviertes Cysteinmotiv in der Region des reifen Proteins (McDonald und Hendrickson 1993, Murray-Rust et al. 1993). Zusätzlich besitzt das reife Protein einen relativ kurzen aminoterminalen Abschnitt, der evolutionär gesehen größere Unterschiede zeigt und eine weitere Unterteilung der TGF- β -Familie ermöglicht. Wenn man BMP-7 anhand des aminoterminalen Abschnitts mit anderen Mitgliedern der Familie vergleicht, zeigen sich innerhalb der BMP Familie maximal Abweichungen von 50%. Ausnahmen stellen hier das BMP-3, BMP-10 und das BMP-11 dar. BMP-3 zeigt eine nur 42%ige Homologie im Vergleich mit BMP-7 (Abb. 1.3.). BMP-5 mit 88% und BMP-6 mit 87% zeigen das größte Übereinstimmungslevel mit BMP-7 (Griffith et al. 1996). Ein Vergleich innerhalb verschiedener Spezies zeigt eine starke evolutionäre Übereinstimmung. Humanes BMP-7 zeigt eine 98%ige Analogie im maturen Protein zu BMP-7 der Maus (Ozkaynak et al. 1991). Die Untergruppe von BMP-5, BMP-6 und BMP-7 ist nahe verwandt mit dem 60A, einem Protein in Drosophila mit unbekannter Funktion (Padgett et al. 1987, Doctor et al. 1992). Ebenfalls hochkonserviert ist die BMP-2/BMP-4-Unterfamilie (Padgett et al. 1987). Ein homologes Protein mit 75%iger Übereinstimmung, das DPP, wurde in Drosophila gefunden. Es kann, wenn man es in Säugetiere implantiert, ebenfalls Knochenbildung induzieren (Sampath et al. 1993).

Abb. 1.3. Einteilung der TGF- β -Superfamilie

1.3.1. Struktur des BMP-3

BMP-3 wird als Präproprotein synthetisiert und besitzt in diesem Stadium 472 Aminosäuren. Das reife Protein besteht aus 110 Aminosäuren des C-terminalen Bereiches des Präproproteins und entsteht, wie oben bereits erwähnt, nachdem das Vorläufermolekül dimerisiert, glykosyliert und proteolytisch gespalten wurde (Wozney et al. 1988). Erst das reife Protein besitzt biologische Aktivität. Bis heute sind strukturell nur zwei BMPs, das BMP-2 und das BMP-7, genauer beschrieben. Stellvertretend für die Sekundärstruktur der BMPs sei hier die Struktur von BMP-2 dargestellt, die im Jahr 1999 von Scheufler et. al aufgeklärt wurde.

Die gemeinsame Struktur aller Mitglieder der TGF- β -Familie wird mit einer linken Hand verglichen. Das bereits oben erwähnte Cysteinmotiv besteht aus 6 Cysteinresten. Diese bilden drei intramolekulare Disulfidbrücken. Der siebte Cysteinrest stellt eine Verbindung zwischen den beiden Peptidketten des Dimers her. Der Cysteinknoten trägt maßgeblich zur Stabilisierung der Struktur des Proteins bei. Durch Entstehen eines hydrophoben Kerns zwischen den beiden Monomeren unterstützt die Dimerisierung des Monomers zusätzlich die Stabilisierung des Proteins. Der Cysteinknoten ist in Abbildung 1.4. in der Handfläche lokalisiert. Die α -

Helix ist im Bereich des Handballens und die zwei parallelen β -Faltblätter sind im Bereich der Finger zu finden (Daopin et al. 1992). Das typische Merkmal der Proteine sind zwei separate antiparallele β -Blätter, von denen sich die zweiten separaten antiparallelen Blätter im Bereich des vierten Fingers überkreuzen. Die α 3-Helix ist vierfach gewunden und steht senkrecht zu den β -Faltblättern. Die β -Blätter lassen sich in neun β -Stränge unterteilen. Diese bilden aber nicht das typische viersträngige β -Faltblatt, weil der Abstand zwischen ihnen zu groß ist, um Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können.

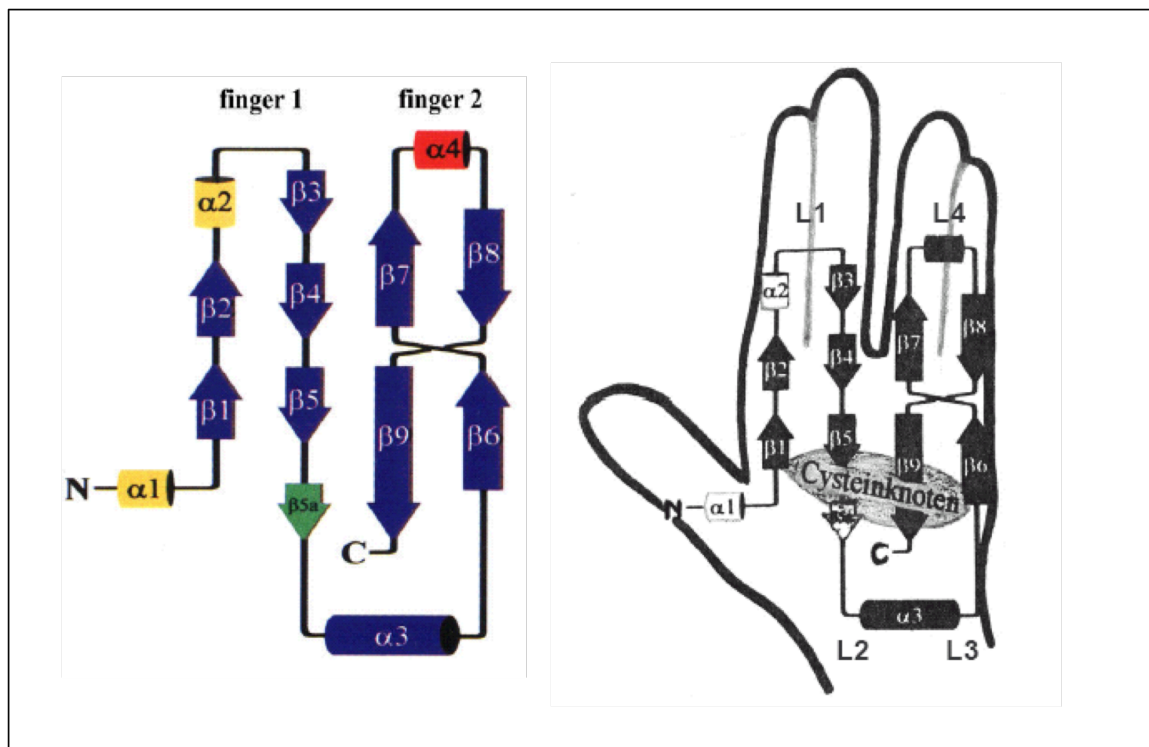


Abb. 1.4. Sekundärstruktur von BMP-2. Die α -Helices sind als Zylinder dargestellt, die β -Faltblattstrukturen als Pfeile. N: N-terminales Ende, C: C-terminales Ende (Scheufler et al. 1999)

Neben den Gemeinsamkeiten bestehen auch Unterschiede in den strukturellen Elementen zwischen den BMPs und den restlichen Mitgliedern der TGF- β -Familie. So sind die Helices α 1 und α 2 bei den bisher untersuchten BMPs nicht vorhanden. Weitere strukturelle Unterschiede bestehen in den Schleifen L1, L2 und L4 im Bereich der Fingerspitzen und in der Orientierung der α 3-Helix. Des Weiteren zeigen BMP-2 und BMP-7 einen Überschuss von negativen Ladungen in den Segmenten der Fingerspitzen, während in den TGF- β s ein Überschuss von positiven Ladungen vorhanden ist. Hinsichtlich der Dimerisierung treten innerhalb der TGF- β -Familie ebenfalls Unterschiede auf. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass der Cysteinknoten und die den Finger formenden β -Faltblätter das Grundgerüst des

Proteins bilden und die Komponenten des Proteins mit geringerer Übereinstimmung innerhalb der Familie für die Rezeptor-Liganden-Bindung wichtig sind (Scheufler et al. 1999).

1.3.2. BMP-3- Der aktuelle Wissensstand

Das Gen für BMP-3 ist bei Menschen auf dem Chromosom 4 lokalisiert. In der Literatur sind auch die Bezeichnungen BMP-3A und Osteogenin geläufig. Ursprünglich wurden die Knochenmorphogenesefaktoren alle als Osteogenine (osteoinduktive Proteine) bezeichnet. Die Spaltung des BMP-Vorläuferproteins in das reife Protein wird durch die katalytische Aktivität von Endopeptidasen bewirkt. Diese gehören zu der zur Familie der Subtilisin Proprotein Convertasen (SPC1=Furin) und sind für die Prozessierung verantwortlich. (Constam und Robertson 1999). Die Spaltung des BMP-3 im Furinspaltmotiv RXXR ergibt so ein 110 Aminosäuren großes BMP-3-Monomer aus einem ursprünglich 450 Aminosäuren großen Propeptid.

Die aktuellen Informationen zu BMP-3 sind widersprüchlich. Obwohl Knochen zu 65 % BMP-3 enthält, welches knocheninduzierende Aktivität besitzt (Luyten et al. 1989), besitzt rekombinantes BMP-3 keine osteoinduktive Aktivität (Takao et al. 1996). Der unprozessierte Vorläufer von BMP-3 hat ein Molekulargewicht von 53,4 kDa. Bezüglich der Größe des reifen Proteins gibt es ebenfalls widersprüchliche experimentelle Ergebnisse. Versuche mit aufgereinigtem Osteogenin aus Rinderknochen ergaben in der reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 22 kDa. Das aufgereinigte Protein ist in der Lage, Knorpel und Knochenbildung zu induzieren (Luyten et al. 1992). Die Arbeitsgruppe um Aaron Daluiski hingegen zeigte das rekombinante BMP-3 bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, je nach Glykosylierungszustand des BMP-3. Diese Arbeitsgruppe zeigte auch, dass BMP-3 ein Antagonist der anderen BMPs in *Xenopus laevis*-Embryos ist. Es inhibiert die BMP-2-vermittelte Induktion von *Msx2* und blockt die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten. Es wird vermutet, dass die beobachteten Effekte über den Activin-Rezeptor vermittelt werden. Zusätzlich zeigten BMP-3 Knockout Mäuse eine doppelt so hohe Knochendichte wie die Wildtyp-Mäuse (Daluiski et al. 2001).

Die Arbeitsgruppe um Zhu stellte bakterielles rekombinantes BMP-3 her. Nach Fermentation und in vitro-Rückfaltung wurde 1 mg des Homodimers in den Musculus

quadrizeps von Mäusen appliziert. Dabei konnte wieder eine knocheninduzierende Wirkung beobachtet werden (Zhu et al. 1999a). Im Jahr 2005 wurde wiederum am Modell des *Xenopus* gezeigt, dass BMP-3 ein Antagonist von BMP-4 und Activin ist. BMP-3 konnte nach Bindung an den ActR-IIB Rezeptor kein R-Smad aktivieren und so die Signaltransduktionskaskade nicht in Gang setzen (Gamer et al. 2005).

Rekombinantes BMP-3 inhibiert des Weiteren die von BMP-2 vermittelte Differenzierung von promyoblastären Zellen zu Osteoblasten. Die antagonistische Wirkung des BMP-3 wird dabei mit der Induktion der Signaltransduktion über den TGF- β /Activin-Signalweg und der damit verbundenen Konkurrenz um intrazelluläre Signalmoleküle des BMP-Signalnetzwerkes in Verbindung gebracht (Bahamonde und Lyons, 2001). Die Hemmung des BMP-2-Signals durch extrazelluläre Bindung des BMP-3 an den BMP-2-Rezeptor wird dabei ausgeschlossen.

Die endgültige Funktion des BMP-3 ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2001 drückt die Frage, die im Raum steht, folgendermaßen aus: „BMP-3, to be or not to be a BMP“, und geht davon aus, dass BMP-3 letztendlich eine essentielle Rolle als Modulator der osteogen aktiven BMPs spielt (Bahamonde und Lyons 2001).

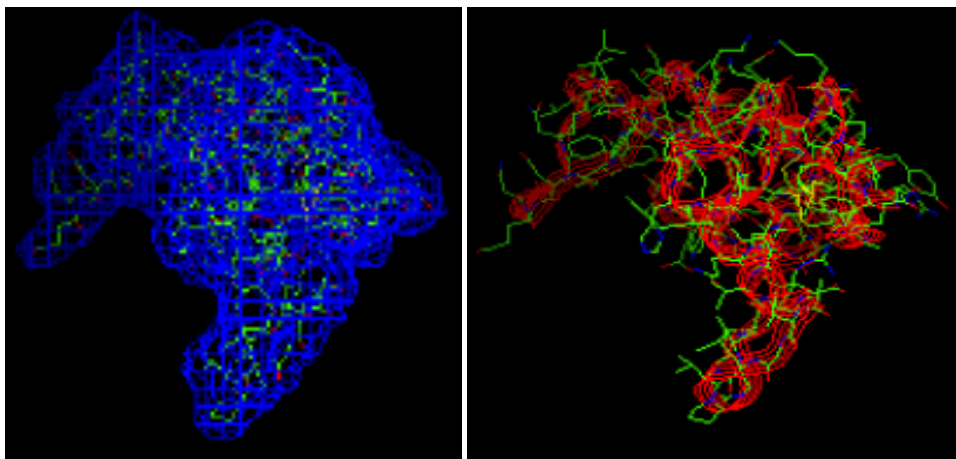


Abb. 1.5. Tertiär-Struktur von BMP-3 aus der Swiss Model Repository-Datenbank

1.4. BMP-Rezeptoren

Wie TGF- β s vermitteln auch die Mitglieder der BMPs ihre zellulären Effekte über Liganden-induzierte Assoziation eines spezifischen heterodimeren Komplexes von zwei verwandten Typ-I und Typ-II transmembranären Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Lin et al. 1992, Massague 1998, Miyazono et al. 2000). Beide Rezeptortypen enthalten eine glykosylierte, cysteinreiche, extrazelluläre Liganden-

Bindungsdomäne, einen kurzen transmembranären Abschnitt und die intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase (Heldin 1997). Zur Zeit sind zwölf Typ-I-Rezeptoren bekannt. Diese werden auch als ALK-Rezeptoren bezeichnet, Activin Receptor Like Kinases. Die Rezeptoren ActR-I (ALK-2), BMPR-IA (ALK-3) und BMPR-IB (ALK-6) zeigten Affinität zu einem oder mehreren BMPs. Von den Typ-II-Rezeptoren sind sieben bekannt. Für ebenfalls drei dieser Rezeptoren sind Bindungsmöglichkeiten mit BMPs beschrieben, dem ActR-II, -IIB und BMPR-II.

Typ-I-Rezeptoren	Typ-II-Rezeptoren
ALK 1	BMPR-II
Activin-R-I (ALK-2)	TBR-II
BMPR-IA (ALK-3)	ActivinR-IIB
Activin-R-IB (ALK-4)	ActivinR-II
TBR-I (ALK-5)	
BMPR-IB (ALK-6)	

Tab. 1.1. Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie bei Säugetieren

Verschiedene BMPs erkennen verschiedene Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität. So bindet BMP-4 bevorzugt an BMPR-IA und -IB. BMP-7 bindet mit einer höheren Affinität an ALK-2 und BMPR-IB als an BMPR-IA (ten Dijke et al. 1994). GDF-5 bindet bevorzugt an BMPR-IB, verglichen mit anderen Typ-I-Rezeptoren (Nishitoh et al. 1996). Die BMPR-I-Subtypen spielen eine wichtige Rolle während der Knochenbildung. Dies konnte durch die Induktion von Chondroblasten- und Osteoblastendifferenzierung nach ektopischer Expression von mutierten, ständig aktiven BMP-Rezeptoren (BMPR) in mesenchymalen Vorläuferzellen gezeigt werden. Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Überexpression von dominant negativen BMPRs die Osteoblastendifferenzierung stört.

BMP-3, welches hinsichtlich aller BMPs mit am reichlichsten im erwachsenen Knochen vorkommt, fungiert an dieser Stelle als ein Antagonist der BMP-Signale und es wird postuliert, dass dies über den ALK-4 Rezeptor vermittelt wird (Daluiski et al. 2001).

BMPs können, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie, auch an nur einen der Rezeptoren binden. Die Affinität der BMPs und das ausgelöste Signal ist bei Bindung der BMPs an beide Rezeptoren gleichzeitig allerdings wesentlich höher (Constam und Robertson 1999). Bemerkenswert ist, dass die Bindung von BMP an einen Rezeptorkomplex nicht zwangsläufig eine Signalkaskade auslöst. Es gibt Rezeptorkombinationen, die -abhängig vom Liganden- eine Bindung

mit gleichzeitiger Signaltransduktion, nur eine Bindung ohne Signaltransduktion oder keine Interaktionen zulassen. Die Liganden-Affinität ist für BMPR-I höher als für BMPR-II. Dies macht es verständlich, dass BMPR-I initial den Liganden bindet und dann BMPR-II in den Liganden-Rezeptor-Komplex miteinbezieht. Bei den TGFs ist dies genau umgekehrt. Der Ligand bindet zuerst an den Typ-II-Rezeptor und dann wird der Typ-I-Rezeptor miteinbezogen.

Wenn ein BMP den heteromeren Komplex induziert hat, phosphoryliert die dadurch aktiv gewordene Rezeptorkinase des Typ-II-Rezeptors den Typ-I-Rezeptor in seiner GS-Region. Die GS-Region ist eine Glycin- und Serin-reiche Region im juxtamembranären Bereich des Typ-I-Rezeptors, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Rezeptors spielt. Der dadurch aktivierte Typ-I-Rezeptor initiiert nun die intrazelluläre Signalweitergabe durch Phosphorylierung weiterer Komponenten der Signalkaskade, inklusive der nukleären Effektorproteine, bekannt als Smads.

1.5. Signaltransduktionskaskade

Der Name Smad setzt sich aus MAD, Mother Against DPP, und SMA, Small Body Size, zusammen. Dies sind zwei Gene, welche in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurden und in diesen Organismen eine wichtige Rolle in der BMP-Signalübertragung spielen (Sekelsky et al. 1995). Bisher konnten neun Smads identifiziert werden, welche eine zentrale Rolle in der Signalübertragung der TGF- β -Familie spielen (Heldin et al. 1997, Massague 1998).

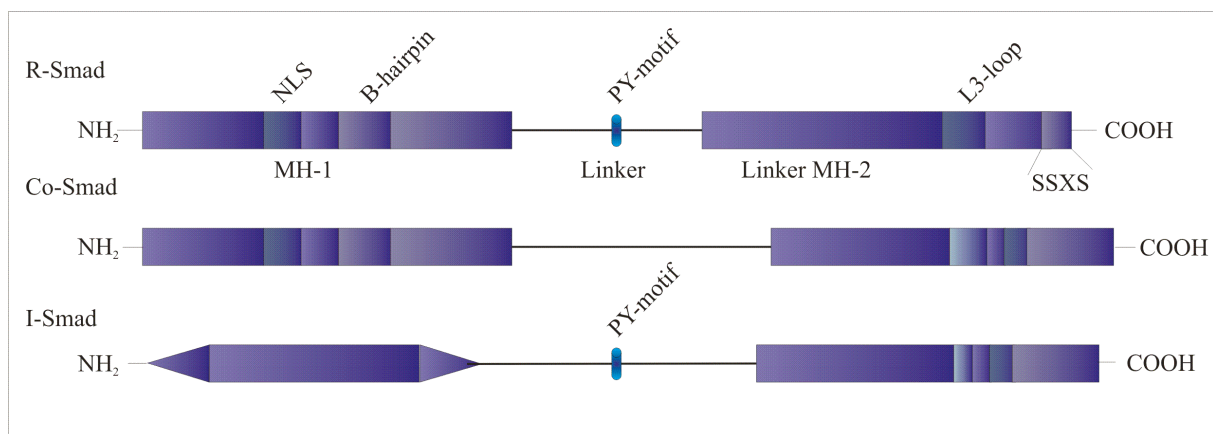


Abb. 1.6. Struktur der Smads. R-Smads, Co-Smads und I-Smads sind ähnlich aufgebaut

Smads werden ihrer Funktion nach in drei Subklassen aufgeteilt. In R-Smads (Signal Transducing Receptor-Regulated Smads), Co-Smads (Common Mediator-Smads) und I-Smads (Inhibitory Smads), welche die Aktivierung von R- und Co-Smads

inhibieren. Zu den R-Smads zählen Smad-1, Smad-2, Smad-3, Smad-5 und Smad-8. Das C-Smad stellt das Smad-4 dar und zu den I-Smads zählen Smad-6 und Smad-7. R- und Co-Smads besitzen konservierte Domänen in ihren carboxy- und aminoterminalen Regionen, bekannt als Mad Homology-1(MH-1)- und MH-2-Domäne. Die beiden Domänen werden durch eine prolinreiche Linker-Region verbunden. Die I-Smads besitzen ebenfalls eine MH-2-Domäne. Die aminoterminal Region zeigt allerdings wenig Ähnlichkeit mit der MH-1-Domäne. Funktionell ist die MH-1-Region in den nuklearen Import und die DNA-Bindung involviert. Die MH-2-Domäne ist an der Rezeptor-Interaktion und der Smad-Oligomerisierung beteiligt. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Smads im Zytoplasma. Die Verbindung zwischen zwei Smads und den Rezeptoren vermittelt SARA. Dieses Protein interagiert mit der MH-2-Domäne von Smad-2 und Smad-3 und erhält sie an der Zellmembran. Die MH-1- und die MH-2-Domänen sind zudem bei der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und Transkriptions-Co-Aktivatoren und Repressoren wichtig (Attisano und Wrana 2000, Massague und Wotton 2000, Moustakas et al. 2001). Die Linker-Region enthält einige Phosphorylierungsstellen, welche entscheidend für die Interaktion mit anderen Signalwegen sind. Es konnte gezeigt werden, dass Smad-1 und Smad-5 eine wichtige Rolle bei der durch BMP-2 und BMP-4 aktivierten Signalkaskade besitzen. Für Smad-5 konnte dies auch in Bezug auf BMP-7 gezeigt werden (Tamaki et al. 1998).

Die R-Smads werden nach BMP-vermittelter Rezeptor-Aktivierung durch den Typ-I-Rezeptor phosphoryliert. Die Interaktion findet hierbei zwischen der L3-Schleife der R-Smads und der L45-Schleife in den BMPs und TGFs statt. Diese Region spielt eine besondere Rolle bei der Spezifität der Bindung der Typ-I-Rezeptoren (Lo et al. 1998). Die Phosphorylierung findet an den beiden SSXS-Motiven statt, die dem carboxyterminalen Ende am nächsten sind (Kretzschmar et al. 1997). Nach der Phosphorylierung der R-Smads formen diese einen heteromeren Komplex mit Smad-4. Bevorzugt bilden sich trimere Smad-Komplexe, d.h. zwei R-Smads und ein Co-Smad (Kawabata et al. 1998, Correia et al. 2001). Dieser Komplex transloziert dann in den Zellkern (Heldin et al. 1997, Massague 1998). Für eine spezifische Sequenz (NLS - Nuclear Localisation Signal) in der MH-1-Domäne von Smad-3, die in allen R-

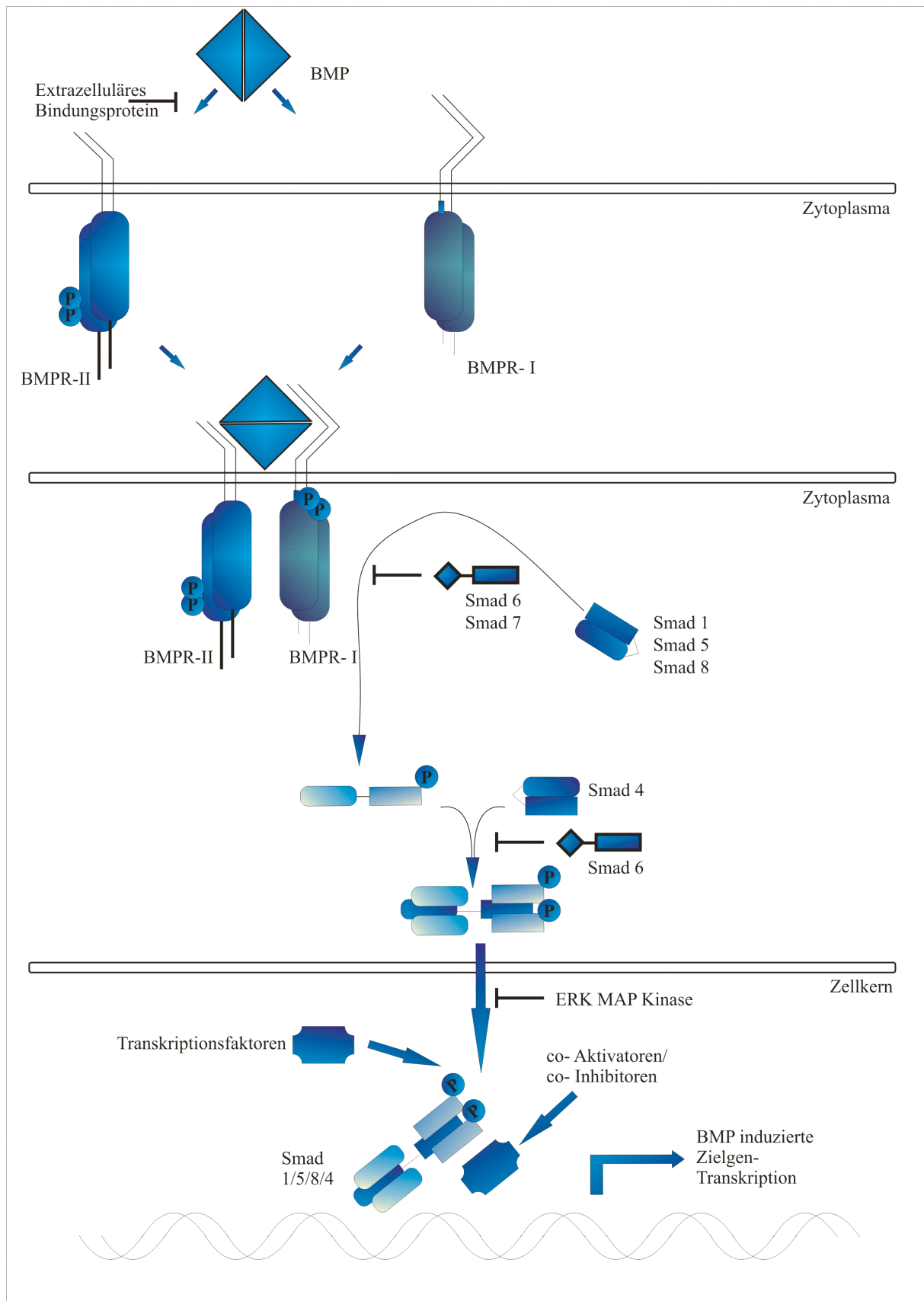


Abb. 1.7. Signalkaskade der BMPs. Smads spielen eine zentrale Rolle in der BMP-vermittelten Aktivierung transkriptioneller Prozesse

und Co-Smads gefunden wurde, konnte gezeigt werden, dass sie für den nuklearen Transport benötigt wird (Xiao et al. 2000b, Xiao et al. 2000a). In Smad-4 wurde eine spezifische leucinreiche Sequenz (NES - nuclear export sequence) gefunden, welche für den nuklearen Export verantwortlich ist. Das Eintreten des Smad-4/R-Smad-Komplexes in den Zellkern wird wahrscheinlich über eine Freilegung der NLS-Sequenz durch die heteromere Komplexbildung stimuliert (Pierreux et al. 2000, Watanabe et al. 2000). Innerhalb des Zellkerns regulieren die Smad-Komplexe direkt oder in Kooperation mit Transkriptionsfaktoren, z.B. Zinkfinger-Proteinen, die Transkription der Zielgene durch direkte Bindung an deren Promotor. Wie oben bereits erwähnt, binden die Smads mit Hilfe ihrer MH-1-Domäne an die Promotoren der Zielgene. Eine hohe Affinität zeigt die MH-1-Linker-Region dabei an eine GTCT-Sequenz (Smad Binding Element, SBE). Multimere von SBE, platziert vor dem Promotor, verstärken das Signal der TGF- β -Familie erheblich (Dennler et al. 1998, Jonk et al. 1998, Zawel et al. 1998).

Das Ende des BMP-Signalweges wird durch Ubiquitinierung und Proteasomen-vermittelter Degradierung von R-Smads direkt durch Smurf-1 (Smad Ubiquitination Related Factor) erreicht. Darüber hinaus bildet Smurf-1 einen Komplex mit Smad-7 und inhibiert zusätzlich die Phosphorylierung der R-Smads. Smurf ist eine E3-Ubiquitin-Ligase der C-WW-HECT-Klasse, welche den Transfer der Ubiquitin-Reste an die Zielproteine katalysiert. Durch diesen Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg erfolgt auch die Regulation des basalen intrazellulären Smad-Spiegels (Zhu et al. 1999b). Die Smad-abhängige transkriptionelle Regulation steht nicht losgelöst von anderen Prozessen innerhalb und außerhalb der Zelle. Sie ist integriert in ein Netzwerk von anderen Signalwegen wie die von TNF- α /NF κ B, EGF/MAPK und Wnt/GSK (Xiao et al. 2003). Der Smad-Signalweg ist der am besten beschriebene und verstandene Signalweg. Dennoch existieren auch andere BMP-induzierte Smad-unabhängige Signalwege (Fujii et al. 1999). So kann die Transkription von BMP-Zielgenen auch durch die TGF- β -aktivierte Kinase-1 (TAK-1), eine MAP-Kinase, welche durch das TAK-1 bindende Protein (TAB-1) aktiviert wurde, induziert werden. Dies erfolgt durch Aktivierung des SAPK- und p38-Signalweges (Yamaguchi et al. 1995, Yamaguchi et al. 1999).

1.5.1. Regulation der BMP-Signaltransduktion

Negative Regulation ist bei jedem Schritt des BMP/Smad-Signalweges möglich. Extrazellulär kann die BMP-Aktivität durch Antagonisten und Pseudorezeptoren inhibiert werden. Die extrazellulären Antagonisten umfassen Noggin, Chordin und die Proteine der DAN-Familie (DAN, Cerebrus, Gremlin, PRDC (Protein Related to Dan and Cerebrus) und Dante). Chordin und Noggin inhibieren die BMP-Signalwirkung über eine Blockierung der BMP-Bindung an ihre Rezeptoren (Piccolo et al. 1996). Bei den Mitgliedern der DAN-Familie kommt ein ähnlicher Mechanismus vor. Hier binden die Antagonisten die BMPs (Piccolo et al. 1996, Hsu et al. 1998, Yokouchi et al. 1999). Im Gegensatz zu den vorher genannten Antagonisten hemmt Follistatin die BMP-Wirkung über eine nicht kompetitive Hemmung der BMP-Rezeptoren, indem es mit ihnen einen trimeren Komplex eingeht (Iemura et al. 1998).

Von einem neuen Mitglied der Cystein-Knoten-Familie der Wachstumsfaktoren, dem SOST-Gen-Produkt Sclerostin, wird basierend auf seiner Aminosäuresequenz vermutet, ebenfalls ein BMP-Antagonist zu sein. Es kann speziell BMPs, allerdings mit geringer Affinität, binden. Dadurch wird die durch BMP induzierte Osteoblasten-Differenzierung und Alkalische Phosphatase-Aktivität gehemmt. Sclerostin verhindert dabei nicht alle BMP-Aktionen, was nahelegt, dass es nur im Kontext der komplexen zellulären Signalprozesse als BMP-Antagonist fungiert. Ebenso besitzt Chordin Co-Faktoren, die dessen antagonistische Funktion verstärken. Für Chordin stellt dies TSG (Twisted Gastrulation) dar (Oelgeschlager et al. 2000).

Einen weiteren extrazellulären, aber membrangebundenen Inhibitor stellt Bambi (BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) dar. Er ähnelt dem Typ-I-Rezeptor der TGF- β -Familie, besitzt aber keine intrazelluläre Kinase (Onichtchouk et al. 1999, Degen et al. 1996). Er inhibiert als ein Pseudo-Typ-I-Rezeptor die Signalweiterleitung wahrscheinlich über eine Verhinderung des Zustandekommens des Typ-I-Rezeptorkomplexes.

Intrazellulär kann das BMP-Signal auf mehreren Wegen inhibiert werden. Die schon erwähnten I-Smads, Smad-6 und Smad-7, inhibieren die BMP- und TGF- β -Signalkaskade. Smad-7 fungiert als ein Inhibitor der gesamten TGF- β -Familie, Smad-6 speziell als Inhibitor der BMPs (Ishisaki et al. 1999). Dies geschieht auf mehreren Wegen: einerseits konkurrieren sie kompetitiv mit den R-Smads um die Bindungsstelle am Rezeptor. Auf der anderen Seite bildet Smad-6 mit den R-Smads Komplexe und verhindert so eine Signalweiterleitung (Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997).

Smad-6 kann außerdem im Zellkern mit einem Homebox-Protein Hoxc-8 interagieren und so als transkriptioneller Aktivator wirken (Bai et al. 2000). Eine weitere inhibitorische Funktion besitzt Smad-6 über die Hemmung von TAK-1 und somit die Inhibition der durch BMP-2 induzierten Apoptose (Kimura et al. 2000). In jüngster Zeit wurden auch noch andere Wege gefunden. So wurde beschrieben, dass Smad-7 mit der HECT-Domäne der Ubiquitin-Ligase Smurf-2 und, wie oben schon beschrieben, mit Smurf-1 konstitutiv interagieren kann. Dies hat den nukleären Export des Smad-7/Smurf Komplexes zur Folge. Im Zytoplasma induzieren Smurf-1 und Smurf-2 den Abbau des TGF- β -Rezeptors durch proteosomale und lysosomale Wege. Smad-7 hat dabei die Funktion eines Adapter-Proteins, um die TGF- β -Rezeptor-Degradation zu vermitteln (Kavsak et al. 2000, Ebisawa et al. 2001). Speziell für BMP-Rezeptoren wurde für Smurf-2 und Smad-6 der gleiche Signalweg postuliert.

Ein weiterer inhibitorischer Mechanismus besteht über Smad-bindende Proteine. Tob, ein Mitglied der Familie der antiproliferativen Proteine, kann R-Smads binden und so das BMP-Signal inhibieren (Yoshida et al. 2000). Ein anderer negativer Regulator ist der transkriptionelle Co-Repressor Ski. Er kann mit Smad-4 und Smad-1 oder Smad-5 über die MH-2-Domäne interagieren. Ein Mitglied der delta EF-1/Zfh-1-Familie, das SIP-1, interagiert ebenfalls mit der MH-2-Domäne der R-Smads und bindet an die 5-CACCT-Sequenz der Promotoren, wodurch die Transkription verhindert wird (Verschuere et al. 1999). XMAN-1, ein nukleäres Membranprotein, inhibiert die Interaktion mit Chromatin, Zellkernlamina und intranukleären Proteinen nach Bindung mittels der C-terminalen Region an Smad-1, Smad-5 und Smad-8 (Osada et al. 2003). Die U-Box-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase CHIP vermittelt den Abbau des Smad-1/Smad-4 Komplexes (Kretzschmar et al. 1997). Als letztes inhibitorisches Protein wäre noch das CIZ (Cas Interactin Zinc Finger) Protein zu nennen. Es fungiert als ein Transkriptionsfaktor durch Bindung an die Konsensus-DNA-Elemente (G/C)AAAAA.

Neben den inhibitorischen Faktoren existieren auch noch verstärkende Einflüsse auf die Regulation des BMP-Signals. So gibt es Faktoren, die die normalerweise schwache Bindung der Smads an die DNA verstärken (Shi et al. 1998). Zunächst wurde in *Xenopus* das Fast-1 Protein entdeckt (Whitman 1998). Ein weiterer Faktor ist OAZ, ein Zink-Finger-Protein, das durch Interaktion mit der MH-2-Domäne mit Smad-2 und Smad-4 interagiert (Derynck et al. 1998, Hata et al. 2000,). Weitere Faktoren, die direkt mit Smad-1 und Smad-5 interagieren, sind Cbfa1 (Core Binding

Factor a1), Cbfa2 und Cbfa3 (Hanai et al. 1999, Pardali et al. 2000). Smad-1, Smad-2 und Smad-4 können zusätzlich mit den transkriptionalen Co-Aktivatoren CBP und P300 interagieren. Diese besitzen eine Acetyl-Transferase-Aktivität. Sie erleichtert die Transkription durch eine Verminderung der Chromosomenkondensation durch Histon-Acetylierung. CBP/p300 kann aber auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (Pouponnot et al. 1998).

1.6. BMP-Zielgene

Durch BMPs können eine Vielzahl von Matrix-Proteinen induziert werden. Hierzu zählen Osteocalcin, Kollagen Typ α , Knochen-Sialoprotein und Decorin (Ahrens et al. 1993, Katagiri et al. 1994, Maliakal et al. 1994). Einige von ihnen, wie Kollagen, stellen direkte Ziele für BMP dar. Andere, wie Osteocalcin, werden indirekt und nur nach längerer Exposition mit BMPs induziert. Die BMP-induzierte Expression von Alkalischer Phosphatase wird oft zum Nachweis für BMP-induzierte Osteoblastendifferenzierung benutzt (Fujii et al. 1999). BMPs zeigten auch, dass sie die Osteopontin-Genexpression aktivieren können. Dies geschieht durch die Verhinderung der Bindung von Hoxc-8, einem Repressor am Osteopontinpromotor, durch aktivierte Smads (Shi et al. 1999). CTGF (Connective Tissue Growth Factor) ist ein frühes Zielgen von BMPs und TGFs. Interessanterweise kann CTGF direkt an BMP-4 und TGF- β -1 binden, dabei die Bindung von TGF- β -1 an seinen Rezeptor verstärken, aber die Bindung von BMP-4 an seinen Rezeptor inhibieren und somit auch den Signalweg (Abreu et al. 2002). Wie oben bereits erwähnt, kann auch die Expression der I-Smads, Smad-6 und Smad-7, durch BMP potentiell stimuliert werden. Sie haben durch ihre negative Feedback-Wirkung eine regulierende Funktion auf die BMP-Signalantwort. BMPs können auch verschiedene Transkriptionsfaktoren induzieren. Für JunB, als ein direktes frühes Zielgen für BMP-2, konnte in Osteoblasten-Vorläuferzellen gezeigt werden, dass es in die Hemmung der myogenen Differenzierung involviert ist. Die direkte Induktion der Homeobox-Gene Msx-1 und Msx-2 wird durch BMPs verursacht. Für diese beiden sowie für BMP-2 und BMP-4 konnte die Expression abhängig vom Entwicklungsstadium in der fetalen und postnatalen Brustdrüse gezeigt werden. BMPs können ebenfalls direkt die Expression der Helix-Loop-Helix Proteine ID1 (Inhibitor of Differentiation), ID2 und ID3 in Osteoblasten und ihren Vorläufern induzieren (Hollnagel et al. 1999). Die

Induktion der ID-Gene wurde auch in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 für BMP-2 nachgewiesen (Clement et al. 2000).

1.7. BMPs in Tumoren

BMPs, ihre Rezeptoren und ihr intrazellulärer Signalweg können im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe andere Expressionsmuster zeigen. Veränderungen konnten sowohl in epithelialen Tumoren (Brust (Clement et al. 2000), Lunge (Langenfeld et al. 2003)) als auch in mesenchymalen Tumorgeweben (Niere, Knochen (Maliakal et al. 1994)) beobachtet werden. Untersuchungen in verschiedenen Tumoren zeigten, dass auf mRNA Ebene in den meisten Fällen eine Hochregulation der BMP-Expression besteht. Für BMP-4, BMP-5, BMP-6, und BMP-7 konnte hierbei eine Hochregulation des Signals in allen untersuchten Tumorgeweben gezeigt werden. Eine Ausnahme bildet BMP-7, welches kontroverse Resultate in Prostata-Tumoren und Nephroblastomen zeigt. Hinsichtlich des BMP-2 gibt es ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen. Es gibt verschiedene Untersuchungen, die eine Hochregulation der BMP-2 Expression auf mRNA Ebene mittels RT-PCR im Gewebe zeigen. Auf der anderen Seite gibt es quantitative Gen-Expressions-Analysen, die eine negative Regulation von BMP-2 in Brustkrebsmetastasen im Vergleich zum normalen Brustgewebe zeigen.

Die BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II weisen tendenziell eine Hochregulation auf. Aber auch Berichte über eine Verringerung der Expression liegen vor.

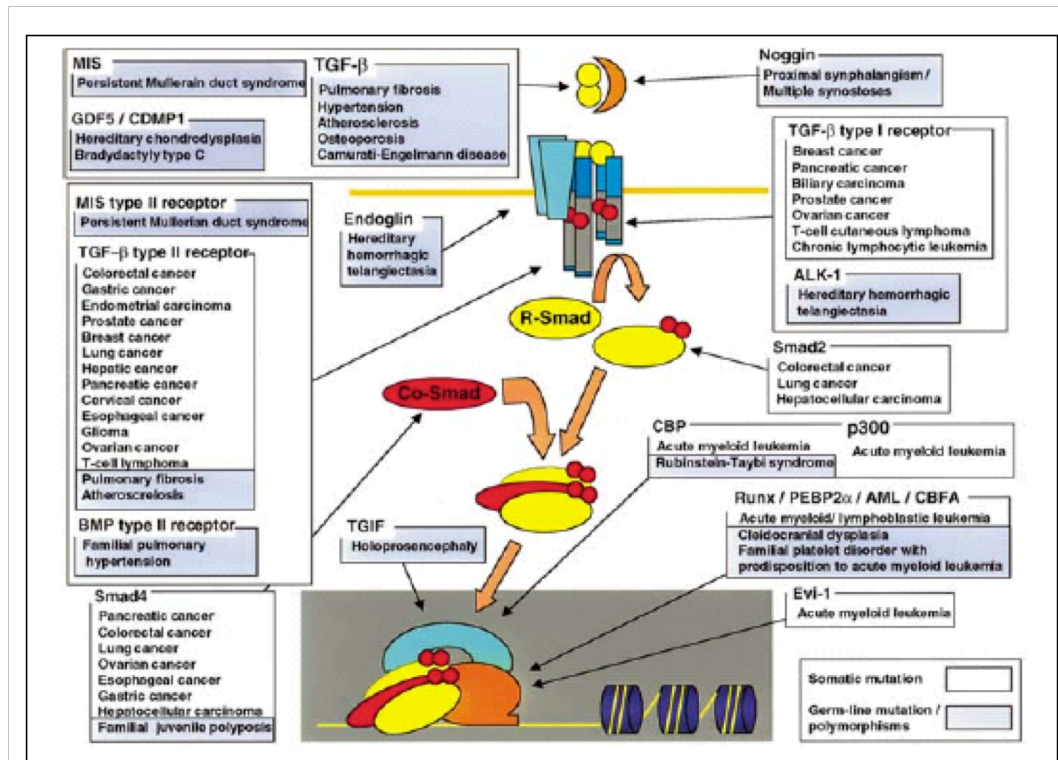


Abb. 1.8. Assoziierte Krankheiten mit TGF-β und BMP-Familie (Miyazono et al. 2001)

1.8. Zielstellung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, die biologische Funktion von BMP-3 genauer zu charakterisieren. Hierzu musste zuerst eine optimale BMP-3-Quelle gefunden werden. Anschließend sollte BMP-3 als biologisch aktives Protein Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie, die für dieses Protein noch etabliert werden musste, isoliert werden. Das gewonnen BMP-3 sollte dann mit Hilfe des Alkalischen Phosphatase-Assay in seiner biologischen Funktion genauer charakterisiert werden.

2.0. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

Die Mammakarzinom-Zelllinien SK-BR-3, MCF-7 und T-47D wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. MCF-7 wurde mit DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. SK-BR-3 wurde mit RPMI und 10% FCS und T47D mit RPMI mit 15% FCS kultiviert. Die Fibroblasten-Zelllinie C2C12 wurde freundlicherweise vom Institut für Biochemie (Prof. Wiederanders) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit DMEM plus 10% FCS und 10 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) kultiviert.

2.2. Zellkultivierung

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank (Heraeus) durchgeführt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig in einem Wasserbad. Die Zellen wurden in 1 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nun wurde minütlich 1 ml Medium hinzugefügt, bis ein Gesamtvolumen von 10 ml erreicht wurde. Das Gemisch wurde zentrifugiert (24 °C, 5 min, 1000 U/min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 7 ml Medium aufgenommen, in eine 25 cm² Gewebekulturflasche überführt und über Nacht im Brutschrank (5% CO₂, 37 °C) belassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet; war der Zellrasen noch nicht zu $\frac{2}{3}$ dicht gewachsen, erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden am nächsten Tag erneut beurteilt. Bei 90% geschlossenem Zellrasen wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin abgelöst, mit 19 ml bzw. 29 ml Medium versetzt und je nach Zelllinie in eine 75 cm² oder 175 cm² Gewebekulturflasche

Material	
Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen Corporation)
Medium	RPMI (Invitrogen)
Zell-Ablösungsmittel	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Invitrogen Corporation)
	Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM EDTA) (Invitrogen Corporation)
Mediumzusatz	Fetales Kälberserum (FCS), (Biochrom Seromed)
Mikroskop	Lichtmikroskop mit 35mm SLR-Kamera (Zeiss)
Software	Axiovision 3.1. Software
Zellkulturflaschen	25cm ² , 75cm ² , 175cm ² Wachstumsfläche (Cellstar, Greiner Frickenhausen)
Zentrifuge	Hettich Universal 30F

Tab. 2.1. Zellkultivierung

überführt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt oder bei nahezu konfluentem Zellrasen wurden die Zellen gesplittet, d.h. abtrypsiniert, abzentrifugiert und auf zwei bis fünf neue Kulturflaschen verteilt.

2.3. Immunoaffinitätschromatographie

Die Immunoaffinitätschromatographie ist eine Methode zur Aufreinigung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Sie beruht auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem entsprechenden Antigen. Speziell mit Hilfe der NHS-Sepharose kann ein Antikörper kovalent mit einer primären Aminogruppe an die Sepharose-Matrix gebunden werden. Die Matrix basiert auf stark quervernetzten Agarose-Kügelchen mit einem „Spacerarm“ bestehend aus 10 Atomen. 1 ml der NHS-Sepharose können 30 mg des IgG-Antikörpers binden.

Material	
Säule	Biorad
Matrix	NHS-Sepharose Amersham
Primärantikörper	200 µg/ ml BMP-3 (H-73) aus dem Kaninchen (Santa Cruz)
Kopplungspuffer	0,2M NaHCO ₃ (pH 8,3)
Startpuffer	1M Tri-HCl (pH 7)
Waschpuffer	0,1M Tri-HCl (pH 7)
Elutionspuffer	0,1M Glycin (pH 2,5)

Tab. 2.2. Säulenmaterial

2.3.1. Gewinnung des Kulturüberstandes von SK-BR-3-Zellen

Die SK-BR-3 Zellen wurden in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert. Zur Gewinnung des Überstandes wurden die Zellen 1:6 gesplittet. Die Zellen wurden über Nacht mit RPMI plus 10% FCS kultiviert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und mit 20 ml serumfreiem Medium pro Flasche versetzt. Dieses wurde 48 Stunden auf den Zellen belassen und nach dieser Zeit abpipettiert und gesammelt. Die Zellen wurden für 24 Stunden wieder mit serumhaltigem Medium inkubiert und anschließend wiederum "serumfrei" gemacht. Nach 48 Stunden wurde das Medium abermals gesammelt. Da der Zellrasen dann nahezu dicht gewachsen war, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:6 gesplittet.

2.3.2. Aufkonzentrierung des Überstandes

Der gewonnene Überstand wurde aufkonzentriert. Eine sehr schonende Methode, mit der Proteine aufkonzentriert werden können, stellt hierbei das Aufkonzentrieren mit Hilfe einer Filter-Einheit dar. Diese besteht aus einer Säule mit einem Filter. Der Filter ist mit verschiedenen Molekulargewichtsgrößen verfügbar. Zum Aufkonzentrieren wurde ein Filter mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa benutzt. Alle Proteine, deren Molekulargewicht kleiner als 10 kDa ist, können den Filter passieren. Alle größeren Proteine sammeln sich in der oberen Fraktion. Je nach Filtereinheit ist mit dieser Methode eine Aufkonzentrierung von einem Arbeitsvolumen von 80 ml bis auf ein Volumen von 300 µl möglich.

Die Filtereinheit wurde zunächst vorbereitet, indem 10 ml ddH₂O zugegeben wurde und diese anschließend für 10 min bei 1000 g zentrifugiert wurde. Dann wurden 80 ml des Überstandes hinzugegeben und die Filtereinheit ca. eine Stunde bei 4°C in einer Zentrifuge mit frei schwingendem Rotor bei maximal 3500 g zentrifugiert. Nach jeweils einer Stunde wurde der restliche Überstand hinzugegeben und wiederum zentrifugiert. Nachdem ein entsprechend hoher Aufkonzentrationsgrad erreicht wurde, wurde der Filter gedreht und in einem zweiten Zentrifugationsschritt der Filter maximal zwei Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Das Überstand-Konzentrat wurde in einem neuen Gefäß aufgefangen.

2.3.3. Trennung der Proteine

Wie oben bereits erwähnt existieren Filtereinheiten mit unterschiedlichen Porengrößen. Um die Proteine im Überstand zusätzlich zu trennen, wurden Filter mit einer Molekulargewichtsgrenze von 50 kDa eingesetzt. Diese funktionieren in gleicher Weise wie die oben beschriebenen Filtereinheiten. Man gab das zu trennende Proteingemisch auf den Filter und zentrifugierte das Gemisch in einer Zentrifuge mit frei schwingendem Rotor. Alle Proteine, die ein höheres Molekulargewicht als 50 kDa besitzen, blieben in der oberen Fraktion. Alle Proteine, die kleiner als 50 kDa sind, sammelten sich in der unteren Fraktion. Diese Prozedur wurde zum einen unter der Zugabe von SDS durchgeführt, zum anderen ohne SDS.

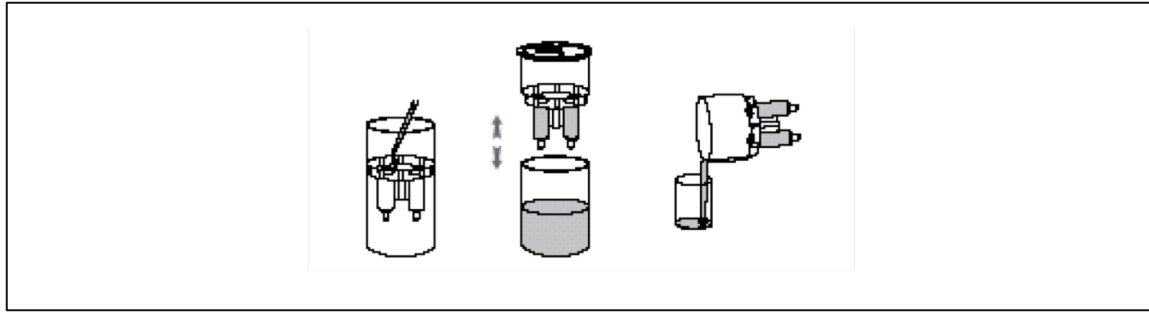


Abb. 2.1. Milliporekatalog-Filtereinheit

Material

Filtereinheit	Centricon Plus-80 mit Ultracel PL Membran (Millipore)
Filtereinheit	Centricon Centrifugal Filter Devices YM-50
Zentrifuge	Heraus 2.0 RF
Zentrifuge	Hettich 30F

Tab. 2.3. Material zur Bearbeitung des Kultur-Überstandes

2.3.4. Immunoaffinitätschromatographie mit NHS-Sepharose

Für eine Säule wurden 500 µl der NHS-Sepharose benötigt. Die Sepharose wurde zunächst fünfmal mit 1,5 ml 0,2 M Natriumhydrogencarbonat gewaschen. Dadurch wurde das Umgebungsmilieu umgepuffert und der 20% Isopropanolanteil, den man zur Aufbewahrung der Sepharose benutzt, wurde ausgewaschen. Dadurch wurde eine günstige Inkubationsumgebung für die Kopplung des Antikörpers an die NHS-Sepharose geschaffen. Zu der NHS-Sepharose wurden anschließend 100 µl der Antikörperlösung gegeben. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad unter ständiger Bewegung inkubiert. Darauffolgend wurde das Inkubat in die Säule gegeben. Nun folgten 10 Waschschrte mit 0,1 M Tri-HCl, um noch nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde als Startpuffer eine 1 M Tris-HCl-Lösung auf den Komplex gegeben. Dies diente zum vollständigen Abblocken der noch freien Bindungsstellen an der NHS-Sepharose. Danach wurde mit fünf Säulenvolumina 0,1 M Tri-HCl gewaschen. Anschließend wurde die zu reinigende Probe über die Säule gegeben. Dieser Vorgang wurde, zur besseren Kopplung des Antigens an den Antikörper, dreimal wiederholt. Dann folgten wiederum zehn Waschschrte zur Entfernung des ungebundenen Materials. Um dann das Antigen zu eluieren, wurden drei Säulenvolumen des Elutionspuffer hinzupipettiert. Das Eluat wurde in jeweils 4 Tropfen mit je 50 µl Volumen aufgefangen, was zu 200 µl Fraktionen führte. Diese wurden in 25 µl 2 M Tri-HCl gepuffert, um den pH-Wert wieder auf proteinverträgliche Werte einzustellen.

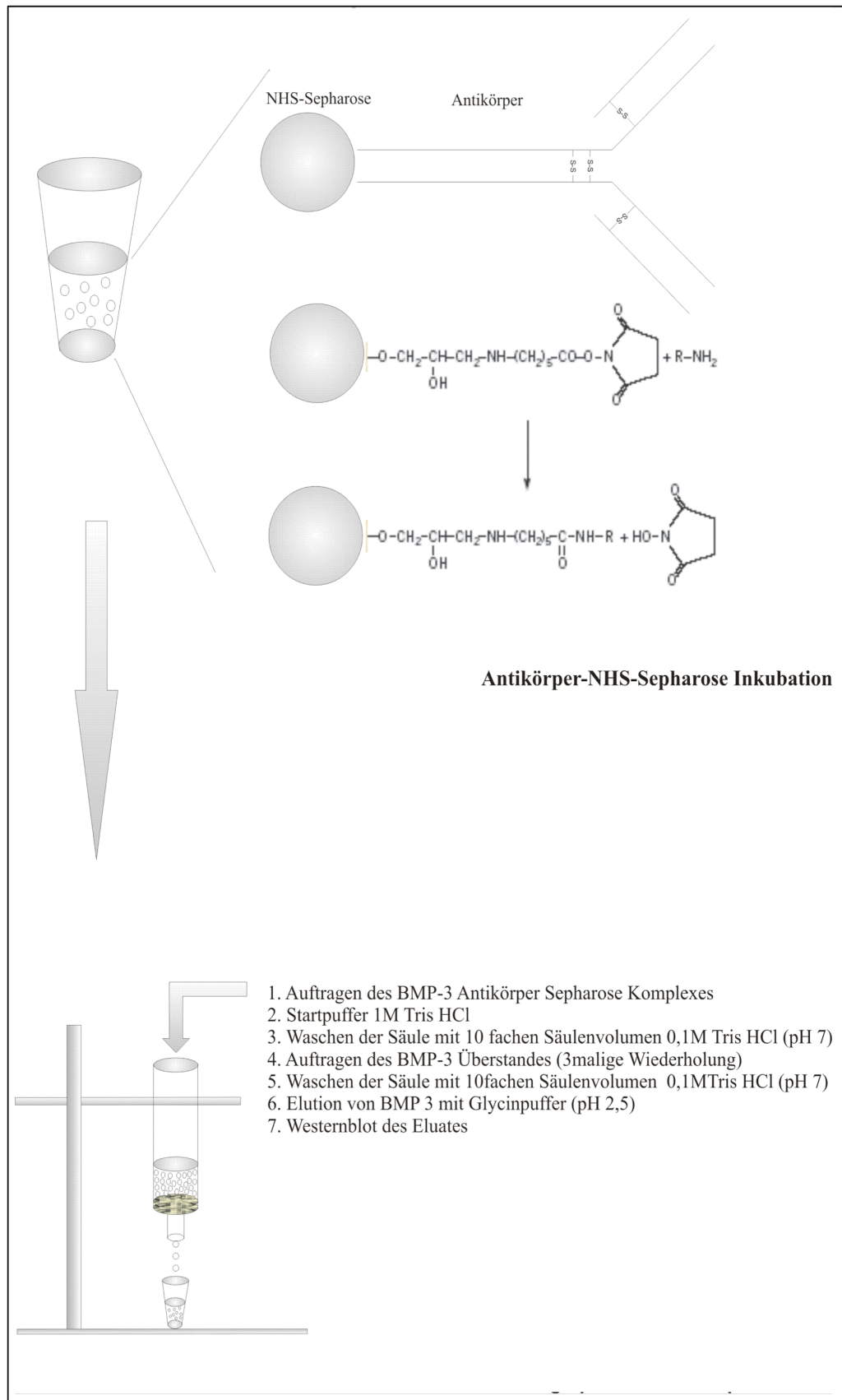


Abb. 2.2. Einzelne Schritte der Immunoaffinitätschromatographie mit NHS-Sepharose.

Oben: Bindung des Antikörpers an den Spacerarm der NHS-Sepharose

Unten: Schritt 1-7 beschreiben den Weg zur Gewinnung des Eluates.

2.4. Immunpräzipitation

Protein-A aus *Staphylococcus aureus* bindet Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne. 1 Mol Protein-A bindet 2 Mol IgG. Hohe Salzkonzentrationen und alkalische pH-Werte verstärken die Bindung zwischen dem Protein-A und dem Antikörper.

Zu 200 µg Protein des aufkonzentrierten Überstandes wurden 30 µl des Antikörpers hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Rotor unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Protein-A-Sepharose hinzupipettiert und wieder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Darauffolgend wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand entnommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Protein-A-Sepharose wurde anschließend dreimal mit dem zehnfachen Protein-A-Sepharose Volumina mit 0,1 M Tris-HCl gewaschen, um nichtgebundene Proteine zu entfernen. Danach wurde durch pH-Wert-Änderung mit 100 µl Glycinpuffer eluiert. Die Sepharose wurde hierfür kurz im Glycinpuffer suspendiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 10 µl 2 M Tris-HCl-Puffer versetzt, um auf wieder physiologische pH-Werte zu erreichen.

Material

Zentrifuge	Heraus 2.0 RF
Matrix	Protein-A-Sepharose
Primärantikörper	200 µg/ ml BMP-3 (H-73) aus dem Kaninchen (Santa Cruz)
Waschpuffer	0,1M Tri-HCl (pH 7)
Elutionspuffer	0,1M Glycin (pH 2,5)

Tab. 2.4. Protein-A-Sepharose

2.5. Deglykosylierung von Proteinen

Endoglykosidasen spalten Oligosaccharide an definierten bestimmten Stellen. Die Endoglykosidasen F und H spalten die endständige Chitobiose-Einheit in bestimmten N-glykosydisch gebundenen Zuckerketten, so dass noch ein Monosaccharidrest am Protein verbleibt. Für die Wirksamkeit einer Endoglykosidase ist die Anwesenheit ihrer Schnittstelle Voraussetzung, doch wird die Enzymaktivität zusätzlich bestimmt durch Konformation und Größe des Polypeptids und Zahl, Anordnung und Art der restlichen Zucker des Oligosaccharides.

Die Deglykosylierung wurde mit Hilfe der Endoglykosidase-H durchgeführt. Als erster Schritt erfolgte die Denaturierung der Proteine. Dazu wurde der Denaturierungspuffer in einem Verhältnis von 1:10 zu der Probe gegeben und das Gemisch bei 95 °C für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden der Reaktionspuffer und die Endoglykosidase-H hinzupipettiert. Danach wurde das Gemisch im Brutschrank bei

37 °C stehen gelassen. Die Inkubationszeiten betrugen jeweils zwei, acht und vierundzwanzig Stunden. Danach wurden die Proben eingefroren, um die Reaktion abzustoppen. Nach Beendigung des Experiments wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Material

Endoglykosidase	Endo H (NEB)
Reaktionspuffer	G5 Reaction buffer 10fach(NEB)
Denaturierungspuffer	Denaturing buffer 10fach (NEB)

Tab. 2.5. Material für die Deglykosylierung

2.6. Proteinanalyse

2.6.1. Proteinisolierung

Zur Gewinnung des Proteinextraktes wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt. Dann wurden die Zellen dreimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und darauffolgend in PBS re-suspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde zu dem Zellpellet der Zell-Lysepuffer hinzugegeben und gemischt, bis das Pellet aufgelöst war. Bei einer Flaschengröße von 75 cm² wurde 1 ml, bei einer Flaschengröße von 175 cm² 3 ml Lysepuffer benutzt. Das Gemisch wurde dann 20 min im Eis belassen und danach für 15 min bei 15.000 U/min zentrifugiert (Hettich Universal 30RF). Der Überstand wurde in ein weiteres Gefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Material

Zelllysepuffer	20 mM HEPES, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ -EDTA, pH 0,8 1 mM EGTA, pH 8,0 1% (v/v) Triton X-100 10 mM Natriumpyrophosphat 50 mM Natriumfluorid 30 mM Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin (Proteaseinhibitor) 10 µg/ml Pepstatin (Proteaseinhibitor) 10 µg/ml Leupeptin (Proteaseinhibitor) 1 mg/ml PefaBloc (Proteaseinhibitor)
Zentrifuge	Hettich Universal 30RF

Tab. 2.6. Proteinisolierung

2.6.2. Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte mit dem Spektrometer nach der Methode von Bradford (Serra und Morgante 1980). Hierzu wurden 10 µl der Probe mit 990 µl Bradford-Reagenz gemischt. Das Gemisch wurde dann fünf Minuten im Dunkeln stehen gelassen. Die Methode basiert auf der Wechselwirkung von Aminosäuren mit Coomassie Brilliant Blau. In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Nach der Eichung des Spektrometers mit Aqua dest. wurden nach fünf Minuten die Emissionen des Gemisches bei 465 nm und 595 nm bestimmt. Mittels einer vorher ermittelten Standardkurve mit Rinderalbuminserum wurde dann die Proteinkonzentration der Lösung errechnet.

Material	
Photometer	Pharmacia LKB Ultraspec III
Bradford-Reagenz	Biorad
Plastik-Küvette	

Tab. 2.7. Konzentrationsbestimmung

2.6.3. Material zur Auftrennung der Proteine

Aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften besitzen Proteine einen unterschiedlichen Anteil an positiven, negativen und ionisierbaren Aminosäureresten. Die Mobilität innerhalb einer porösen Gelmatrix ist prinzipiell nicht nur von der Größe der Moleküle, sondern auch von deren Nettoladung unter den jeweiligen Bedingungen abhängig. Um die Auftrennung innerhalb eines elektrischen Feldes zu gewährleisten, wurde die Proteinprobe zuvor mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol, um die Disulfidbrücken zu spalten, versetzt und fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Dadurch wurden die Proteine denaturiert und aufgrund hydrophober Wechselwirkungen kam es zu einer gleichmäßigen Beladung der Proteine mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladung der Proteine überdeckt wurde. Die entstehenden SDS-Protein-Mizellen besaßen nun ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis und konnten so, nur aufgrund der Größe, nach dem Molekularsiebeffekt elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mittels Standard ließen sich die Molekulargewichte ermitteln. Bei der Verwendung von 0,1% SDS im Polyacrylamidgel besteht für bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der

SDS-Proteine-Komplexe. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Als Trennmedium wurde Polyacrylamid verwendet. Dieses wurde mittels Co-Polymerisation von Acrylamid mit einem Vernetzer (N,N-Methylenbisacrylamid(Bis)) aufgrund einer durch freie Radikale ausgelösten Polymerisationsreaktion gebildet. Die Radikale entstanden durch Interaktion von Ammoniumpersulfat (APS) mit Tetramethylethyldiamin (TEMED). Hierdurch entstand ein komplexes, flexibles, dreidimensionales Netzwerk.

Die Elektrophorese erfolgte in einem SDS-haltigem Gel und diskontinuierlichem Tris-HCL-Glycin-Puffersystem (Laemmli, 1970). Dies verhindert die Aggregation von Proteinen beim Eintritt in das Gel und ist Voraussetzung für eine hohe Trennschärfe. Die Proben wurden, nachdem sie in einem Volumenverhältnis von 1:10 mit dem Probenpuffer versetzt wurden und wie oben bereits beschrieben bei 95 °C inkubiert wurden, aufgetragen. Das 5%ige Sammelgel ist dabei großporig und das Trenngel (10%-15%) dient dann der Auftrennung der Proteine. Als Molekulargewichtsmarker dienten der Rainbow-Marker®, der Kaleidoscope-Marker® und der Cruz-Marker®.

Die Mini-Gel-Elektrophoreseapparatur von Biorad wurde entsprechend der Anleitung gereinigt und zusammengesetzt. In einem Falcon-Tube wurden 20 ml der Trenngellösung angesetzt und nach kurzem Schwenken mit Hilfe einer Pipette 7 ml der Trenngellösung rasch zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Anschließend wurde zur Hemmung der Polymerisation und für einen gleichmäßigen Abschluss des Trenngels jeweils mit 1,5 ml Ethanol (20%) überschichtet. Nach ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen. Nun wurde das Ethanol mittels Filter entfernt und mit ca. 4 ml des Sammelgels eine neue Schicht gegossen. Dann wurde der Probenkamm bis zum Abschluss des Glasrandes eingetaucht. Nach Abschluss der Polymerisation kam das Gel in die Gelkammer. Diese wurde dann mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei 40 mA pro Gel durchgeführt (Gelgröße: 85 mm x 90 mm x 1,5 mm). Nach dem Gellauf schloss sich in bestimmten Fällen eine Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau an. Ansonsten wurden die Gele für einen Immunoblot verwendet.

Material	
Trenngel 12%	12% RapidGel XL, Solution 40% (Amersham) 37,5 mM Trenngelpuffer; 2 M Tris-HCl, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,03 (w/v) APS 0,1% (w/v) TEMED
Sammelgel 5%	5%(v/v) RapidGel XL, Solution 40% (Amersham) 24 mM Sammelgelpuffer; 1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,1%(w/v) SDS 0,1%(w/v) APS; 0,1%(w/v) TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 1%(w/v) SDS
Gelapparatur	Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System
Färbellösung	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G (Sigma)
Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 70% ddH ₂ O

Tab. 2.8. Material für die Gelelektrophorese

2.6.4. Western Blot

Wie oben bereits beschrieben kommt es durch die SDS-Page zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Um diese weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen, ist der Transfer der Proteine auf eine immobilisierende, synthetische Membran ein gängiges Verfahren (Western Blot). Diese Technik ermöglicht es, das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Nachweisspezifität immunologischer Verfahren zu kombinieren. Das Semi-Dry-Blotting Verfahren nach Kyhse-Andersen stellt hierfür ein geeignetes Verfahren dar (Khyse-Anderson, 1984). Hierbei liegt ein Gel-Membran-Sandwich zwischen zwei Plattenelektroden. Der Transferpuffer befindet sich auf getränkten Filterpapieren zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich.

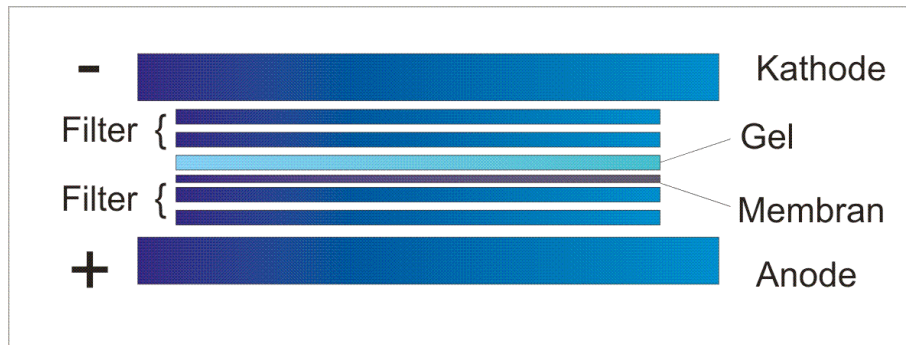


Abb. 2.3. Aufbau des Blot-Sandwich; die Proteine wandern von der Kathode zur Anode

Die verwendete PVDF-Membran musste vor Gebrauch zur Aktivierung für eine Minute in Methanol inkubiert werden. Anschließend wurde die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen und wurde danach, ebenso wie das Gel, für 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Bau des Sandwichs wurde zur Entfernung eventueller Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran das Sandwich zweimal mit einem Falcon-Röhrchen überrollt. Das Blotten erfolgte bei einer Stromstärke von 0,40 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 25 V für eine Dauer von 90 min. Zur Blot-Kontrolle wurde das Gel anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

Material	
Blot Apparatur	Semi-Dry Apparatur (BioRad)
Filterpapier	Criterion XT (BioRad)
Blot-Membran	PVDF-Membran (BioRad)
Transferpuffer	25 mM-Tris Base, 190 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,037% (w/v) SDS

Tab. 2.9. Material für Western Blot

2.6.5. Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern

Die nun auf der PVDF-Membran befindlichen Proteine besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher antigener Epitope, die mit den dagegen gerichteten Antikörper Wechselwirkungen eingehen können. Diese Tatsache macht man sich beim Nachweis der Proteine zunutze.

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran geblottet wurden, wurde diese mit ddH₂O abgewaschen. Anschließend wurde die Membran wahlweise eine Stunde bei 4 °C auf dem Schüttler in 25 ml Block-Puffer inkubiert oder über Nacht im Block-Puffer belassen. Dadurch wurden die restlichen Proteinbindungstellen der Membran

abgesättigt. Nun folgte das Waschen der Membran mit PBS-T-Waschpuffer, jeweils für zweimal 5 Minuten und ein drittes Mal für 10 min. Darauffolgend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:100) für eine Stunde bei 4 °C auf dem Schwenker. Die Membran wurde danach wie oben schon beschrieben erneut gewaschen und letztendlich mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:2000) für eine Stunde inkubiert und anschließend wieder gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte über die Chemolumineszenzmessung. An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Bei Zugabe von ECL-Lösung katalysiert dieses Enzym die Oxidation von Luminol und löst so eine Chemolumineszenz aus, die dann gemessen werden kann.

Die Inkubationsdauer mit der ECL-Lösung betrug eine Minute. Danach wurde die Membran kurz mit Filterpapier getrocknet und in Haushaltsfolie eingeschlagen. Anschließend erfolgte die Detektion, einerseits auf digitalem Weg mittels CCD Kamera, und andererseits auf analogem Weg, mit Hilfe eines Röntgenfilmes. Die Expositionsdauer betrug jeweils 1 min, 5 min und 15 min, wobei diese je nach Signalstärke angepasst wurde. Der exponierte Film wurde anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

Material	
Waschpuffer	PBS (Gibco) mit 0,05% (v/v) Tween
Block Puffer	PBS (Gibco) mit 0,05% (v/v) Tween, 5% Magermilchpulver
Antikörper Puffer	PBS (Gibco) mit 0,05% (v/v) Tween, 1% Magermilchpulver
Primärantikörper	200 µg/ml BMP-3 (H-73) aus dem Kaninchen (Santa Cruz)
Primärantikörper	200 µg/ml BMP-3 (C-20) aus der Ziege (Santa Cruz)
Sekundärantikörper	400 µg/ml Anti-Ziege (Santa Cruz)
Sekundärantikörper	400 µg/ml Anti-Kaninchen (Santa Cruz)
ECL- Lösung	Lösung A (Amersham)
	Lösung B (Amersham)
Film	Hyperfilm ECL (Amersham)
Entwicklermaschine	Amersham

Tab. 2.10. Material für den immunologischen Nachweis von Proteinen

2.7. Alkalische Phosphatase-Assay

In der Klinik ist die Alkalische Phosphatase kein Einzelenzym, sondern setzt sich aus den Aktivitäten verschiedener Isoenzyme aus Darm, der Plazenta, der Leber, der Nieren und dem Knochen zusammen. Deren Bestimmung ist indiziert bei der Diagnostik bestimmter Krankheiten, wie z.B. Osteomalazie oder Rachitis. Hohe Alkalische Phosphatase-Werte finden sich in Osteoblasten beispielsweise bei

erhöhter osteoblastischer Aktivität während des Skelettwachstums im Kindes- und Jugendalter. Wie oben bereits erwähnt kann auch BMP-2 die Aktivität der Alkalischen Phosphatase erhöhen.

2.7.1. Kultivierung der C2C12- Zellen

Auf die C2C12-Zelllinie und deren Kultivierung wird hier noch mal speziell eingegangen, da jene gewissen Abweichungen im Vergleich zu den anderen Zelllinien aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit unterliegt.

Die C2C12-Zelllinie stammt aus sich regenerierendem Muskelgewebe der Maus. Die Kultivierung erfolgte wie bereits oben beschrieben mit DMEM plus 10% FCS und 10 mM NaHCO₃. Die Zellen besitzen die Fähigkeit sich zu differenzieren. Da die Differenzierung durch Zell-Zell-Kontakte beschleunigt bzw. ausgelöst wird, ergab sich die Notwendigkeit die Zellen nur subkonfluent wachsen zu lassen. Die Zellen wurden in diesem Sinne einem hohem Splitverhältnis von 1:5 bis 1:20 unterzogen und in 175 cm² Kulturflaschen gezüchtet. Um die Zellen möglichst schonend abzulösen, wurde anstatt Trypsin Accutase benutzt.

Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden danach mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 8 ml Accutase auf die Zellen gegeben und diese 8 min in den Brutschrank gestellt. Darauffolgend wurde die Accutase mit den sich darin befindenden abgelösten Zellen abgesaugt und das Gemisch abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in 4 ml (v_s) Medium re-suspendiert, bis keine Zellklumpen mehr vorhanden waren und das Gemisch homogen war.

Anschließend wurde die Zellzahl im Zellzählgerät (Coulter) gemessen. Dazu wurde aus den 4 ml Zellgemisch 50 µl entnommen und in 20 ml Isoton, d.h. in einer Verdünnung von 1:400, pipettiert. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors erhielt man so die Zellkonzentration c_s pro Milliliter. Die Messung erfolgte dreimal und der Mittelwert wurde gebildet.

Mit Hilfe der Formel $v_z = v_s \cdot ((c_s / 1,5 \cdot 10^5) - 1)$ wurde anschließend das Volumen (v_z) errechnet, welches hinzupipettiert werden musste, um die nötige Zellkonzentration von $2 \times 10^5 / 100$ µl zu erreichen für die dann folgende Aussaat in die 96 well Mikroplatte.

Mit Hilfe der Multikanalpipette wurden nun 10^5 Zellen in einem Volumen von 100 µl Medium pro well ausgesät. Dies erfolgte zügig, um eine möglichst gleiche Zellzahl

pro well zu erreichen. Nach der Aussaat wurde die Platte für drei Stunden im Brutschrank belassen, um die Zellen anwachsen zu lassen.

Material	
Mikroplatte	96 Well mit Deckel mit Flat bottom (Greiner) Wachstumsfläche 38,48 mm ² Volumen: 300 µl
Kulturflasche	Wachstumsfläche: 175 cm ² (Greiner)
Kulturflaschenmedium	DMEM 10% FCS, 10 mM NaHCO ₃
Mikroplattenmedium	DMEM 2% FCS, 10 mM NaHCO ₃
Ablöser	Accutase (Greiner)
Multikanalpipette	Matrix
Zellmeßgerät	Coulter Z1 (Beckmann Coulter)

Tab. 2.11. Material für das Ausplattieren der C2C12-Zellen

Während des Anwachsens der Zellen wurden die später hinzuzugebenden Proben angesetzt. Dabei wurde die spätere Verdünnung von 1:2 berücksichtigt. Nach 3 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop kurz begutachtet und 100 µl der vorher angesetzten Proben pro well hinzupipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden im Brutschrank belassen.

2.7.2. Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Als Substrat der Alkalischen Phosphatase wurde p-Nitrophenolphosphat eingesetzt. Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat zu den Produkten p- Nitrophenol und Phosphat um. Das Produkt p-Nitrophenol besitzt bei 405 nm ein Absorptionsmaximum. Die Zunahme der Extinktion bei 405 nm ist direkt proportional der Alkalischen Phosphatase-Aktivität für einen definierten Zeitbereich. 48 Stunden nach dem Inkubationsbeginn mit den Proben wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen. Das Medium wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und von dem vorher angesetzten Lysepuffer 50 µl pro well hinzupipettiert. Das Gemisch wurde dann 15 min stehen gelassen. Anschließend wurden 150 µl Alkalische Phosphatase Reagenz pro well hinzugesetzt. Die Mikroplatte wurde danach schnell in den Mikroplatten Reader gestellt, um die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm zu messen. Die Messung erfolgte 15 Minuten lang und alle 9 Sekunden wurde ein Messwert aufgenommen. Am Ende der 15 Minuten wurde nochmals eine Endpunktbestimmung durchgeführt.

Material	
Lysepuffer	20 mM Tri-HCl pH 10 1 mM MgCl ₂ 0,1 mM ZnCl ₂ 0,1 % Triton-X-100
Alkalische Phosphatase Reagenz A (pH 7,5)	1,214 M Diethanolamin Puffer 0,607 mM MgCl ₂
Alkalische Phosphatase Reagenz B	4 Tabletten (120 mM p-Nip) Sigma Aldrich Fulka 2,5 ml ddH ₂ O
Versuchsansatz für die Messung bei 405nm in der Mikroplatte	50 µl Lysepuffer 150 µl Probenstartreagenz = 200 µl (7,5nM p-Nip; 1,11 M Diethanolamine; 0,667 mM MgCl ₂ ; 0,025 ZnCl ₂)
Mikroplatten Reader	Mikroplatten EASIA READER (Medgenix Diagnostics Brüssel)
Software	Softmax pro Version 2.6.1.

Tab.2.12. Material für die Messung der Aktivität der ALP

2.8. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Total RNA Kits (Qiagen, Hilden). Mit diesem Verfahren konnte Gesamt-RNA größer als 200 bp gewonnen werden. Zur Lyse der Zellen wurden zu jeder Gewebekulturflasche 500 µl RLT-Puffer (Qiagen) und 5 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Dieser Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, eine stark denaturierende Verbindung, und inaktiviert damit die RNasen. So wurde die RNA vor Abbau geschützt.

Das Zelllysate wurde dann mit Zellschabern gewonnen und mit der Pipette auf einen Filter (Qias shredder Spin Column) gegeben und zentrifugiert (24 °C, 2 min, 14000U/min, Eppendorf Centrifuge 5415 C). Noch enthielt das visköse Gemisch große Mengen an hochmolekularer genomischer DNA, die zum Teil im Filter hängen blieb. Zum Filtrat wurden 500 µl 70%iges Ethanol hinzupipettiert und das Gemisch dann auf eine spezielle m-RNA-bindende Silicamatrix (RNeasy Spin Column) gegeben. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert (24 °C, 10 sec, 10000 U/min.).

Nun folgten einige Arbeitsschritte, um die Membran von störenden weiteren Kontaminationen zu säubern. Zunächst wurden 500 µl RW-1-Waschpuffer (Qiagen), eine in pH-Wert und Salzgehalt exakt eingestellte Lösung, auf die Silicamatrix gegeben und 5 Minuten einwirken gelassen. Anschließend wurde zentrifugiert (24 °C, 10 sec, 10000U/min) und zweimal mit 300 µl RPE-Puffer (Qiagen) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde zentrifugiert, nach dem ersten Schritt 15 sec, nach dem zweiten Waschschrift 2 Minuten lang, jeweils bei Raumtemperatur und 10000U/min.

Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser in zwei Arbeitsschritten mit jeweils 30 µl und 20 µl. Anschließend wurde jeweils für eine Minute mit 10000U/min zentrifugiert.

Die RNA wurde dann in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei –80 °C gelagert oder gleich zur Synthese der cDNA verwendet.

Material					
RNA-Isolierungs-Kit (Qiagen)	Zellysepuffer	RLT	1%	(v/v)	β-Mercaptoethanol
	u. Guanidiniumisothiocyanat				
	Zentrifugationssäulchen				
	RNA-Zentrifugationssäulchen	(Bindung sämtlicher RNA an Silicagel-Membran)			
	70% Ethanol				
	Waschpuffer RW-1 (enthält Guanidinisocyanat)				
	RPE-Puffer (enthält 96% Ethanol)				
	RNase freies Wasser				

Tab. 2.13. Material zu Isolierung der RNA

2.8.1. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der Konzentration der RNA erfolgte photometrisch. Die Bestimmung der RNA-Konzentration war von großer Bedeutung, um später gewährleisten zu können, dass jeweils die gleiche Menge an RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Das Photometer wurde zunächst mit destilliertem Wasser geeicht. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten, da diese UV-Licht nicht absorbieren. Die RNA wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt (3 µl RNA auf 297 µl destilliertem Wasser) und ihre Absorption bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm ermittelt. RNA hatte ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, während bei 280 nm Proteine und bei 320 nm andere Verunreinigungen erfasst werden konnten. Das Photometer konnte so die Reinheit des Eluates berechnen und aus dem Absorptionswert bei 260 nm die RNA-Konzentration bestimmen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Gesamt-RNA-Konzentration errechnet.

2.9. cDNA-Synthese

Die Reverse Transkription dient der Generierung von cDNA. Grundlage der Reversen Transkription ist die Funktion des Enzyms „Reverse Transkriptase“, das aus einer RNA-Matrize, ausgehend von einem Primer, nach dem Prinzip der Basenpaarung einen komplementären DNA–Strang synthetisieren kann.

Für die cDNA-Synthese wurde pro Ansatz 1 µg Gesamt-RNA benötigt. Es wurde ein Oligo(dT)-Primer aus 16-20 Thymidinen verwendet, der an die Poly(A)-Sequenz am

3'-Ende eukaryotischer mRNA-Moleküle band. Die mRNA konnte aber bis zu 10 kb lang sein und die Protein-kodierende Sequenz lag in manchen Fällen in Nähe des 5'-Endes. Da die Reversen Transkriptasen aber durchschnittlich nur cDNAs von 1-2 kb Länge synthetisieren, wurden zusätzlich Random-Primer benutzt. Sie waren ein Gemisch aus unterschiedlichen Hexanukleotiden und banden damit an beliebiger Stelle der RNA-Sequenz. So waren nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit alle mRNA-Bereiche in dem cDNA-Gemisch vertreten.

Zur Synthese lagerte sich an das freie 3'-OH-Ende des Primers gemäß der Basenpaarung des komplementären Stranges das jeweilige Desoxyribonukleosidtriphosphat.

Zur Hemmung der RNasen wurde zusätzlich RNasin in das Reaktionsgemisch gegeben. Dieses Enzym bildete nicht-kovalente Komplexe mit RNasen und inhibierte somit ihre Aktivität.

Zur Durchführung der cDNA-Synthese wurde die Gesamt-RNA (1 µg RNA auf 8,5 µl Wasser) für 5 min im Wasserbad erhitzt. Währenddessen wurde das Reaktionsgemisch auf Eis vorbereitet.

Material	
cDNA Ansatz (11,5 µl)	4 µl 5fach Reaktionspuffer (250mMol Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂) 2 µl DTT (0,1M) 1 µl Oligo-dT-Primer 2 µl dNTP-Mix 0,5 µl Rnasin (20U) 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Tab. 2.14. Material zur c-DNA Synthese

Die 11,5 µl des Reaktionsgemisches wurden nun zur RNA gegeben und zunächst bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, um den Primern die Zeit zu geben, sich an den RNA-Strang anzulagern. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei kam es zur eigentlichen reversen Transkription. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Ansätze für 5 min bei 95 °C ins Wasserbad gegeben, wobei das Enzym denaturierte. Die gewonnene cDNA konnte nun zur Polymerasekettenreaktion verwendet oder zunächst bei -20 °C gelagert werden.

2.10. PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR (PCR= polymerase chain reaction) dient der spezifischen exponentiellen Amplifikation eines Abschnittes auf einer DNA-Matrize. Die PCR erlaubt semiquantitativ Rückschlüsse auf die Menge der mit der cDNA korrelierenden mRNA eines bestimmten Proteins. Bei der Methode dient der zuvor aus der Reversen-Transkriptase-Reaktion gewonnene Strang (RT= Reverse Transkription) cDNA als Matrize (template), entlang der nun mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase die DNA vervielfacht wird.

Material	
PCR- Ansatz	18,3 µl ddH ₂ O 2,5 µl 10fach PCR-Puffer (Qiagen) 1,0 µl Primer-Gemisch (jeweils 10 µM sense- und antisense-Primer) 2,0 µl dNTP-Gemisch (jeweils 10 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (entspricht 1U, Qiagen)

Tab. 2.15. PCR-Ansatz

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, wobei stets darauf geachtet wurde, dass die Taq-Polymerase als letztes Reagenz zu dem Gemisch gegeben wurde. 1 µl der cDNA wurde jeweils in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) vorgelegt, 24 µl von dem Mix dazugegeben, der Ansatz wurde kurz gemischt, abzentrifugiert und danach mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Öl hatte den Sinn, die Verdunstung bei den später zu erreichenden hohen Temperaturen weitestgehend zu vermeiden. Parallel zu den Proben mit jeweils dem gleichen Primer wurde stets eine Kontrolle geführt, in die statt der cDNA 1 µl Aqua dest. gegeben wurde, um so unspezifische Reaktionen und Verunreinigungen zu entdecken. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden nun zur eigentlichen Polymerasekettenreaktion in den Thermozykler gestellt. Dieser enthält Thermoblöcke, die zyklisch erhitzt und abgekühlt werden können und so die notwendigen Bedingungen für eine PCR ermöglichen. Initial wurden alle Proben für 3 min auf 95 °C erhitzt, um den DNA-Doppelstrang zu denaturieren. Dieser lange Denaturierungsvorgang war notwendig, um die sehr komplexen DNA-Strukturen aufzulösen. Anschließend folgte ein Zyklus aus 3 Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation, der je nach eingesetztem Primer 25-35mal durchlaufen wurde. Zur Denaturierung wurden die Proben für jeweils 30 sec auf 95 °C erhitzt. Das folgende Annealing diente der Anlagerung der Primer an die DNA-Sequenz. Die Bedingungen hierfür hingen sehr stark von den jeweiligen Primern ab. So wurde je nach Primer der Ansatz für eine bestimmte Zeit auf eine bestimmte Temperatur abgekühlt, um die besten Bedingungen für die Bindung an die DNA zu

gewährleisten. Daran schloss sich jeweils für 30 sec die Phase der Elongation an. Dies geschah bei einer Temperatur von 74 °C, wo das Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase lag. Nach dem letzten Zyklus wurde eine Phase der terminalen Elongation eingebaut, das heisst fünf weitere Minuten bei 74 °C. In dieser abschließenden Phase konnten alle bereits synthetisierten Stränge die vollständige Länge erreichen.

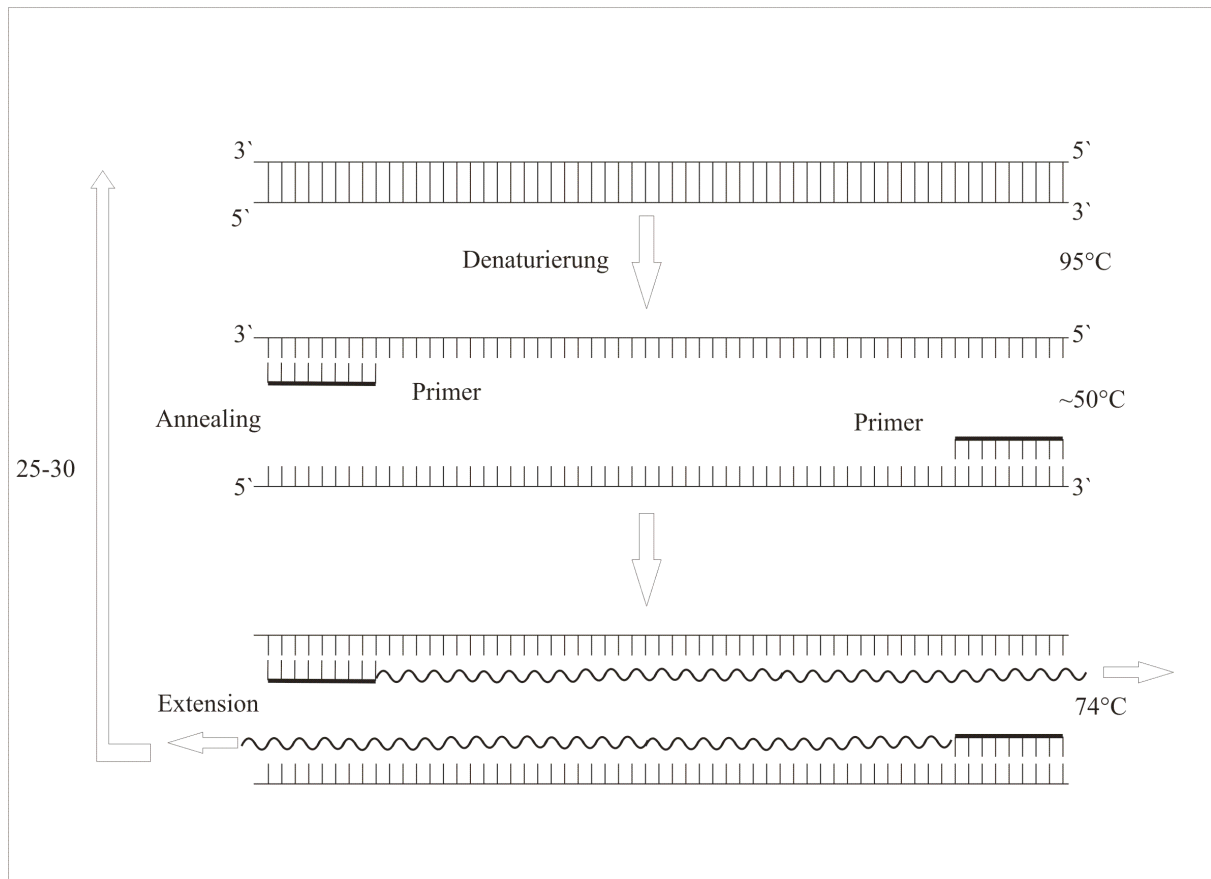


Abb. 2.4. Ablauf Polymerase-Kettenreaktion

2.11. Auftrennung der PCR-Produkte mit einem Agarosegel

Die DNA-Fragmente wurden im nächsten Schritt auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.11.1. Herstellung der Agarose-Gels und Probenauftrag

Eine Gelelektrophorese-Apparatur (Biometra, Göttingen) wurde zunächst mit 1x TAE-Puffer gefüllt, die Gelträger abgedichtet und der benötigte Kamm hineingestellt. Zum Gießen des Gels (1%ig) wurde nun 1 g Agarose in eine

Laufpuffer	1x TAE Puffer 242 g Trisbase 57,1 ml Eisessig pH 8,0
Agarose	Agarose ultra pure (Invitrogen)
Gefäß	Schottflasche (500 ml)
PCR Ladungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM Na ₂ EDTA 30% (v/v) Glycerin 0,1% (v/v) SDS 0,025% (v/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromid	

Tab. 2.16. Materialien Agarose-Gel

Glasflasche eingewogen und anschließend auf 100 ml mit 1xTAE Puffer aufgefüllt. Das Ganze wurde in einer Mikrowelle bei 90 Watt für circa 20 min aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Wenn die Agaroselösung dann auf ungefähr 60 °C abgekühlt war, wurde in das Gel 2 µl/100 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) gegeben, das Gel in die Gelkammer gegossen und dort zur Auspolymerisation stehen gelassen. Der organische Farbstoff Ethidiumbromid interkalierte zwischen den DNA-Basen-Paaren. So machte es die Oligonukleotidbanden sichtbar, denn durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt, emittierte es selbst Licht im roten Bereich (590 nm).

Das auspolymerisierte Gel wurde nun mit 1x TAE-Puffer bedeckt, der Kamm vorsichtig gezogen und mit dem Auftrag der Proben begonnen. In jede Tasche kam ein Gemisch aus 15 µl des PCR-Produktes und 5 µl PCR-Ladungspuffer. Zusätzlich wurde in eine der Taschen zur Molekulargewichtsbestimmung ein 1 kb DNA-Längenstandard-Marker (Invitrogen) gegeben.

2.22. Gellauf und Auswertung

Der Gellauf erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA (Powergerät LKB 2103, Power Supply, Biochrom) und war beendet, wenn der Laufmarker Bromphenolblau etwa 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Nun wurde das Gel auf einen UV-Tisch abgelegt und die Fluoreszenz der Ethidiumbromid-markierten Banden mit Hilfe eines Videokamera-basierten Computersystems aufgenommen (Herolab, Wiesloch).

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der BMP-3-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien

Unser Ziel war die Gewinnung von nativem BMP-3 aus biologischem Material. Dazu musste zuerst eine entsprechende Zelllinie mit ausreichender Expression des Proteins gefunden werden. Die Suche nach der geeigneten Expression erfolgte mit Hilfe einer semiquantitativen PCR. Als Zelllinien benutzten wir die bei uns im Labor etablierten Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, SK-BR-3 und T47D.

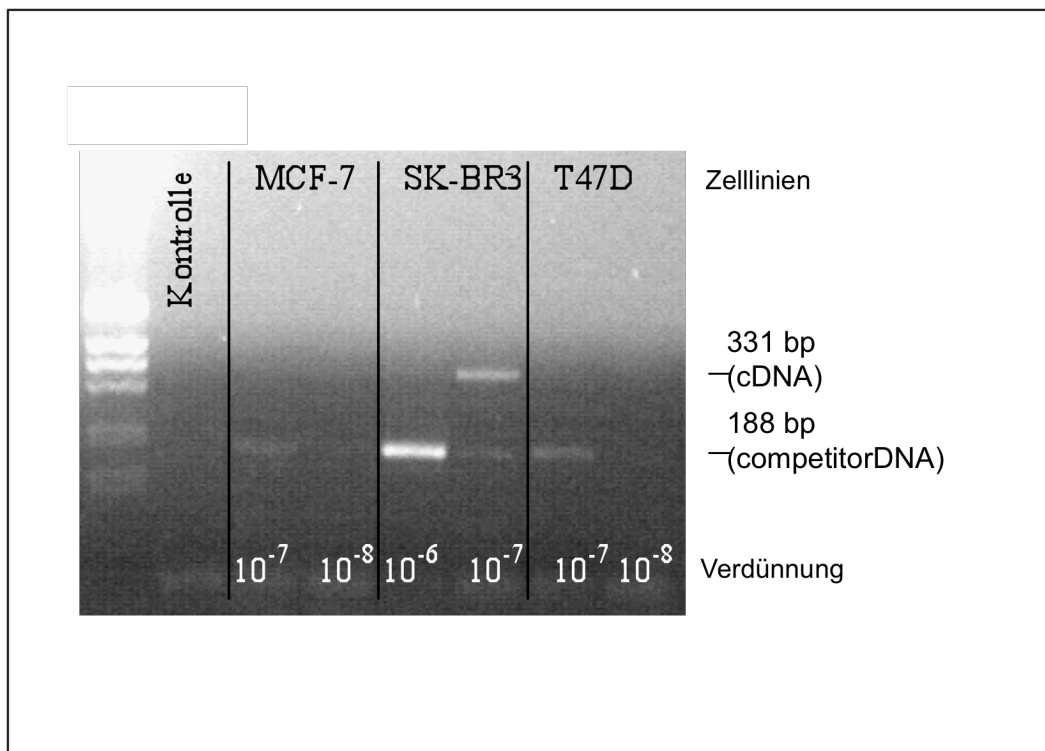


Abb. 3.1. Expression von BMP-3 in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien. RT-PCR, SK-BR-3 zeigt ein deutliches Ansteigen des BMP-3-Signals zwischen der Konzentration von 10^{-6} und 10^{-7} im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien und zeigt somit die größte Expression des BMP-3 in unseren getesteten Zelllinien

In Abbildung 3.1. konnte für die Mammakarzinomlinien MCF-7, SK-BR-3 und T47D mittels einer semiquantitativen RT-PCR gezeigt werden, dass SK-BR-3 die Mammakarzinom-Zelllinie darstellt, welche vermehrt BMP-3 exprimiert. Die Zahlen 10^{-7} , 10^{-6} , und 10^{-8} sind die Verdünnungen der Ausgangskonzentration von 5 µg/ml der Kompetititor-DNA. Die Abbildung 3.1. zeigt weiter, dass in dem dargestellten Konzentrationsbereich in MCF-7 und T47D keine BMP-3 Expression nachweisbar ist. Bei SK-BR-3 beträgt die Konzentration zwischen 10^{-6} und 10^{-7} , da zwischen diesen beiden Konzentrationen die Proben-cDNA ein ansteigendes Signal zeigt. Die Negativ-Kontrolle in diesem Bild enthält keine cDNA. Die Bande bei 331

Basenpaaren entspricht BMP-3 und ist am stärksten ausgeprägt in den SK-BR-3 Zellen. Deshalb wurden für die weiteren Experimente SK-BR-3 Zellen benutzt.

3.2. Nachweis von BMP-3 Protein

Da wir das Protein aufreinigen wollten, erfolgte nun die Bestätigung der Expressionsdaten auf Proteinebene. Hierzu musste zuerst ein geeigneter Antikörper gefunden werden. Um BMP-3 auf Proteinebene nachzuweisen, standen drei kommerzielle Antikörper von Santa-Cruz Biotechnology zur Verfügung. Diese binden an unterschiedlichen Stellen im Bereich des Proteins und besitzen unterschiedliche Affinität zum Zielprotein. Zwei der Antikörper zeigen Affinität zum N-terminalen und C-terminalen Bereich des BMP-3 und werden in der Ziege produziert.

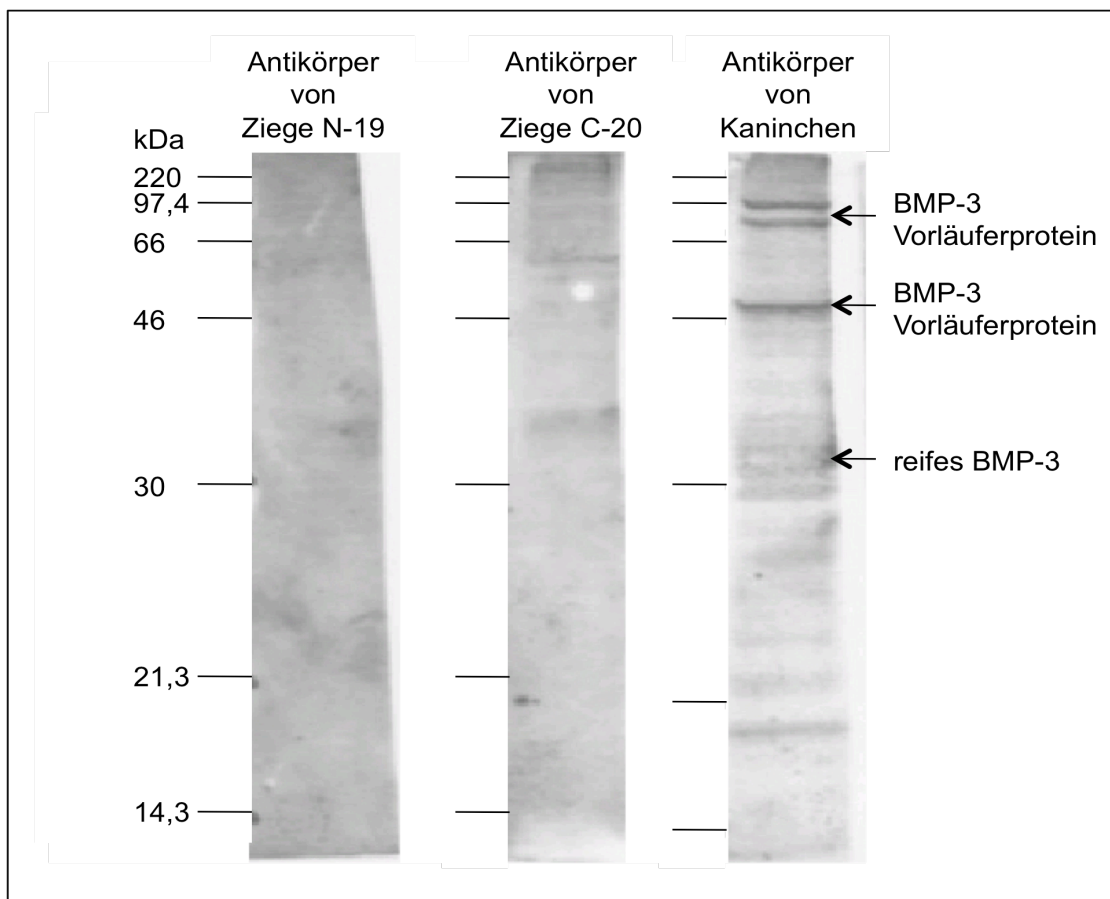


Abb. 3.2. Test der drei verfügbaren BMP-3-Antikörper von Santa Cruz mit Proteinlysate aus SK-BR-3-Zellen. Der Antikörper aus dem Kaninchen zeigte das beste Signal in der BMP-3 Detektion. Die anderen beiden Antikörper wurden nicht weiterbenutzt, SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

Der in unseren Versuchen genutzte polyklonale Antikörper wurde im Kaninchen produziert und besitzt Affinität zu den Aminosäuren 363 bis 435 des BMP-3 Proteins. Er zeigte in der Detektion des BMP-3 das deutlichste Signal und war laut Hersteller

auch für die Immunoaffinitätschromatographie verwendbar. Man sieht in Abbildung 3.2. im Bereich von 97 kDa zwei starke Banden, die Vorläufern von BMP-3 entsprechen, ebenso bei ca. 46 kDa. Die schwache Bande bei ca. 30 kDa stellt das reife BMP-3 dar. Die Antikörper aus der Ziege zeigten kein ausreichendes Signal im Blot (Abb. 3.2.). Für die weiteren Affinitätsexperimente und Western-Blots wurde der Kaninchen-BMP-3-Antikörper benutzt.

3.3. Bestimmung der optimalen BMP-3-Protein-Quelle

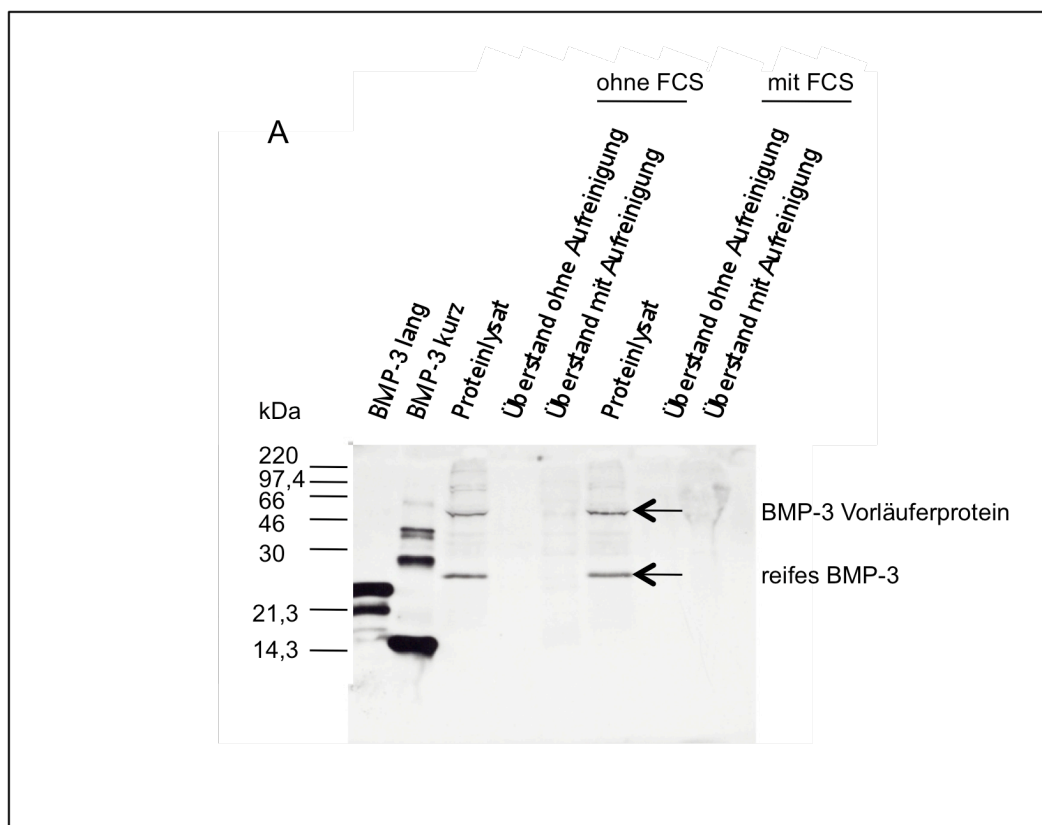
3.3.1. Vergleich Zellkulturüberstand mit Zelllysat

Da wir nun im Besitz eines geeigneten Antikörpers waren, erfolgte die Suche nach der optimalen zellulären BMP-3-Quelle. In einer Veröffentlichung von 1992 zeigten Israel et al., dass die BMPs, hier speziell BMP-2, in mehreren Schritten synthetisiert werden. Zum einen sah man ein amino-terminales Pro-Peptid bei 40-45 kDa (Vorläuferprotein, das am amino-terminalen bzw. N-terminalen Ende abgespalten wird), ein ungespaltenes 60 kDa großes Vorläuferprotein und das mature aktive Homodimer (30 kDa), bestehend aus 18-20 kDa großen Untereinheiten (Israel et al. 1992). Die Isolation des biologisch aktiven Homodimers war unser Ziel.

Wir entschieden uns aufgrund der (mittels semiquantitativer PCR nachgewiesen) höchsten BMP-3 Expression in SK-BR-3, aus dieser Zelllinie natives BMP-3 zu isolieren. Zuvor jedoch benötigten wir noch eine genauere Analyse der Expression auf Proteinebene. Diese erfolgte mit Hilfe des Westernblots.

Als Kontrolle verwendeten wir rekombinantes kurzes und langes BMP-3, freundlicherweise von Dr. Peter Hortschansky zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten BMP-3-Proteine werden in E.coli hergestellt und besitzen keine Glykosylierungen. Der Unterschied zwischen beiden ist die Aminosäureanzahl. Beim kurzen BMP-3 wird eine kanonische Spaltsequenz benutzt, um noch einen Teil des BMP-3 abzuspalten, der vermutlich für die biologische Funktion nicht von Bedeutung ist. Das lange BMP-3 ist thermodynamisch instabiler als das kurze BMP-3. Kurzes BMP-3 bildet vermehrt Aggregate. Analysiert wurde der SK-BR-3-Überstand und das Zell-Proteinlysat. Die Zellen wurden in gleicher Menge ausgesät mit 1×10^6 Zellen. Anschließend wurde jeweils nur mit RPMI oder mit RPMI+ 2% FCS inkubiert. FCS wurde benutzt, um ein besseres Wachstum der Zellen zu ermöglichen, zeigte aber zu große Indifferenzen im Blot. Nach 24 Stunden wurden der Überstand abgenommen. Überstand meint in allen Experimenten das RPMI und

die Stoffe, die die SK-BR-3-Zellen in das RPMI-Medium sezerniert haben. Die Zellen wurden lysiert. Zusätzlich wurde ein Aufkonzentrationsschritt beim Mediumüberstand eingefügt. Dieser wurde mit Hilfe eines Filters mit einem Cut off von 5.000 Dalton 200fach aufkonzentriert, um keine Proteine größer als 5000 kDa, insbesondere BMP-3, zu verlieren. Anschließend wurden von den Proben jeweils 25 µg auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3. dargestellt.



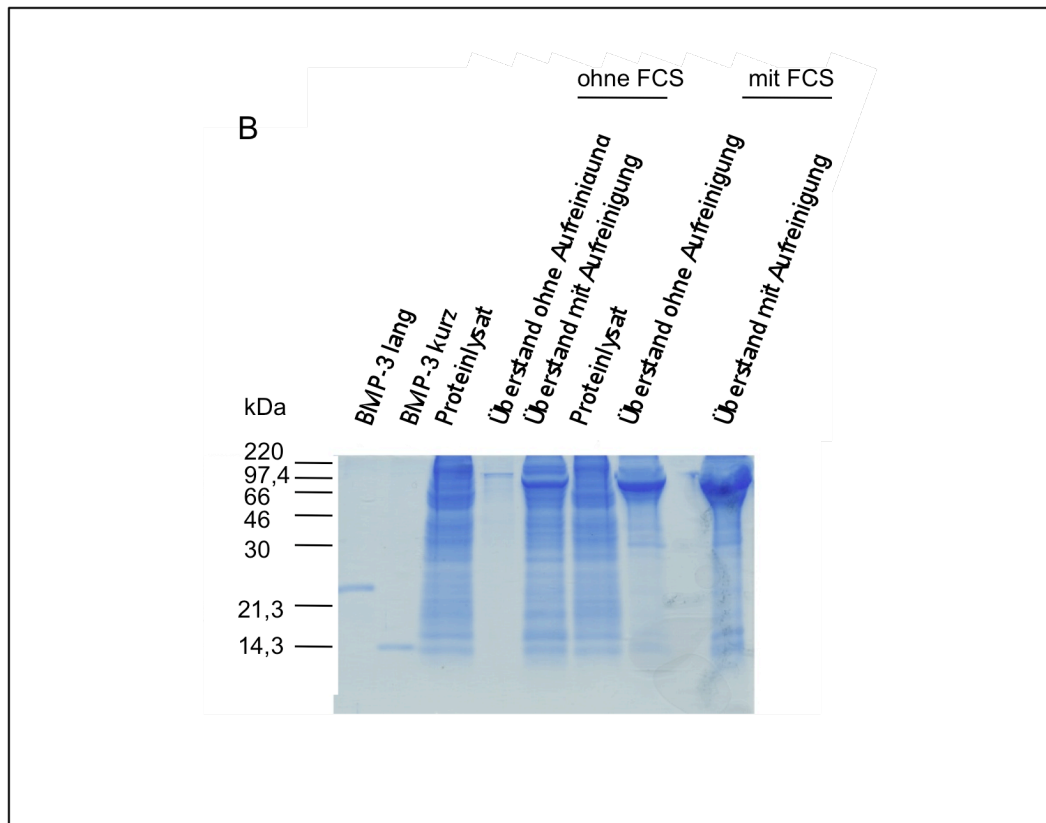


Abb. 3.3. BMP-3 Expression in Zellkulturüberstand und Zelllysate.

A: Western-Blot-Analyse, SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

Rekombinantes BMP-3 lang (23 kDa) und BMP-3 kurz (16 kDa) dienen als Kontrolle. Nur im Proteinlysate sind BMP-3-Banden zu sehen. Die 200fache Aufkonzentrierung im Überstand war zu gering, um Banden detektieren zu können

B: Coomassie-Färbung, SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

Rekombinantes BMP-3 lang (23 kDa) und BMP-3 kurz (16 kDa) dienen als Kontrolle. Im Überstand mit Aufreinigung und Proteinlysate sind noch eine Menge andere Proteine vorhanden. BMP-3 scheint also nur einen geringen Anteil an der Gesamtproteinmenge auszumachen

Wir sahen in unseren Westernblots in Abbildung 3.3. unterschiedliche BMP-3-Banden. Sowohl die Coomassie-Färbung als auch der Western Blot zeigten keine Bande, die genau dem rekombinanten Kontroll-BMP-3 bei 16 kDa für das kurze BMP-3 und 23 kDa für das lange BMP-3 zuzuordnen war. Ursache hierfür kann der unterschiedliche Glykosylierungsstatus des nativen BMP-3 sein (im Gegensatz zu dem rekombinanten unglykosylierten Protein). Die Bande im Proteinlysate zeigte das lange BMP-3 bei 30 kDa. Im Überstand waren die Verdünnungen noch zu hoch, um eine Bande im Westernblot zu detektieren. Die Proben, die mit FCS inkubiert wurden, zeigten keine auswertbare Bande, vermutlich aufgrund der hohen Proteinmenge, die im Kälberserum vorhanden war und das Laufen der anderen von SK-BR-3 produzierten Proteine behinderte. Die Coomassie-Färbung als unspezifische Proteinfärbung zeigt, dass sich noch eine Vielzahl von anderen

Proteinen im Proteinlysate und dem Überstand befinden. Ziel war trotz des fehlenden sichtbaren Nachweises des BMP-3 im Überstand aufgrund der niedrigen Proteinmenge die Gewinnung des BMP-3 aus dem Überstand, da im Proteinlysate ein hoher Anteil an Vorläuferproteinen vom BMP-3 zu finden ist (Israel 1992)

3.4 Etablierung und Optimierung der Aufreinigung von BMP-3 aus dem Zellkulturüberstand

3.4.1. Technisch: Antikörper und Säulenverfahren

Als eine geeignete Methode, das BMP-3 aus dem vorher untersuchten SK-BR-3-Zellkulturüberstand zu gewinnen, erschien uns die Immunoaffinitätschromatographie. Die Immunoaffinitätschromatographie ist eine Methode zur Aufreinigung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Sie beruht auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem entsprechenden Antigen. Speziell mit Hilfe der NHS-Sepharose kann ein Antikörper kovalent mit einer primären Aminogruppe an die Sepharose-Matrix gebunden werden. Die Matrix basiert auf stark quervernetzten Agarose-Kügelchen mit einem „Spacerarm“ bestehend aus 10 Atomen. 1 ml der NHS-Sepharose kann 30 mg des IgG-Antikörpers binden.

Um den Antikörper bzw. seine Bindung mit dem Liganden BMP-3 genauer zu testen und zu optimieren, verwendeten wir ein 1:1 Gemisch aus dem rekombinanten langen BMP-3 und dem kurzen rekombinanten BMP-3. Dieses Gemisch wurde im 10 ml NaHCO_3 0,2 M suspendiert und über den an die NHS-Sepharose gekoppelten Antikörper gegeben. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann wurde die Säule ausgiebig gewaschen. Anschließend wurde mit dem Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen mit einem Volumen von ca. 50 μl wurden aufgefangen und per Western-Blot ausgewertet.

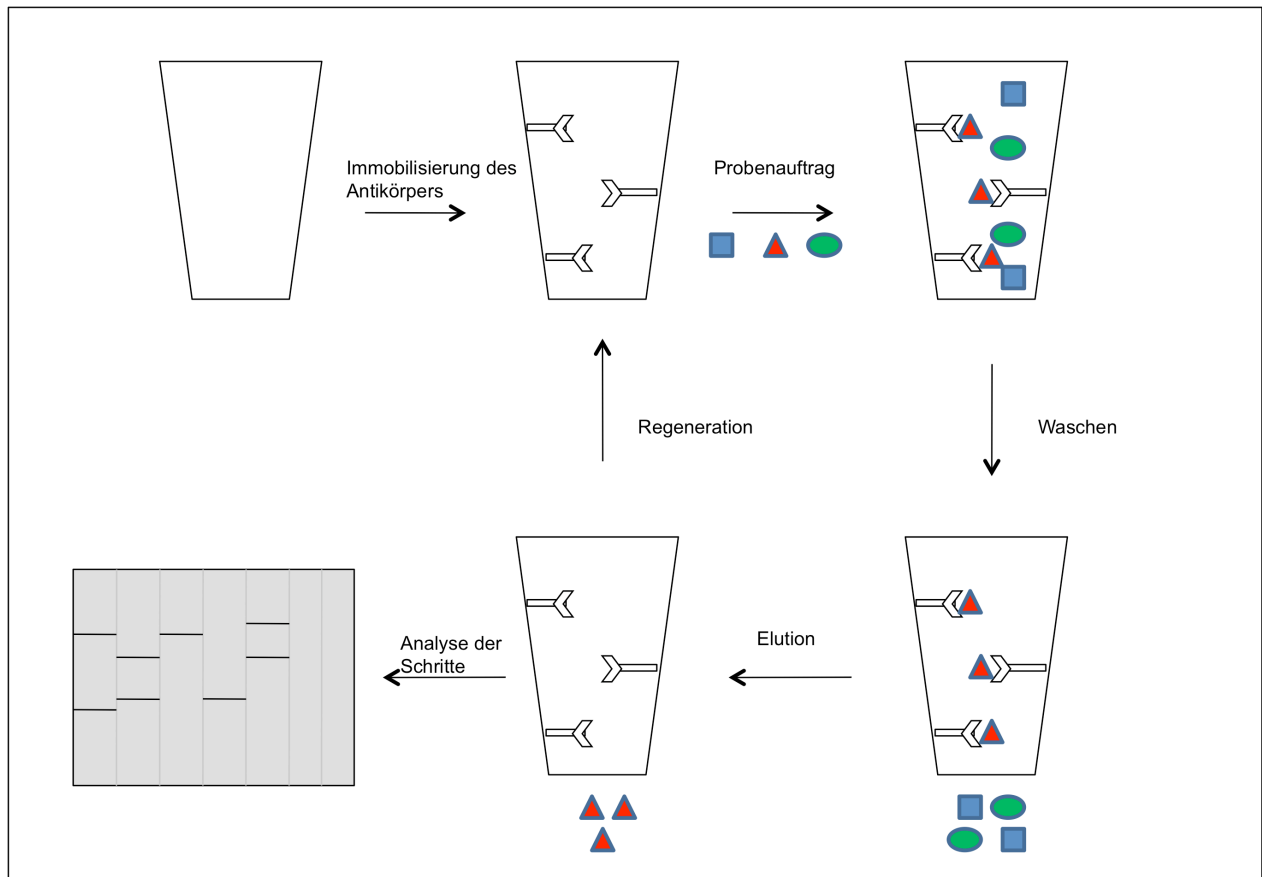


Abb. 3.4. Schematische Darstellung der Immunoaffinitätschromatographie zum besseren Verständnis der nun folgenden Western-Blots (Abb. 3.5.- 3.8.)

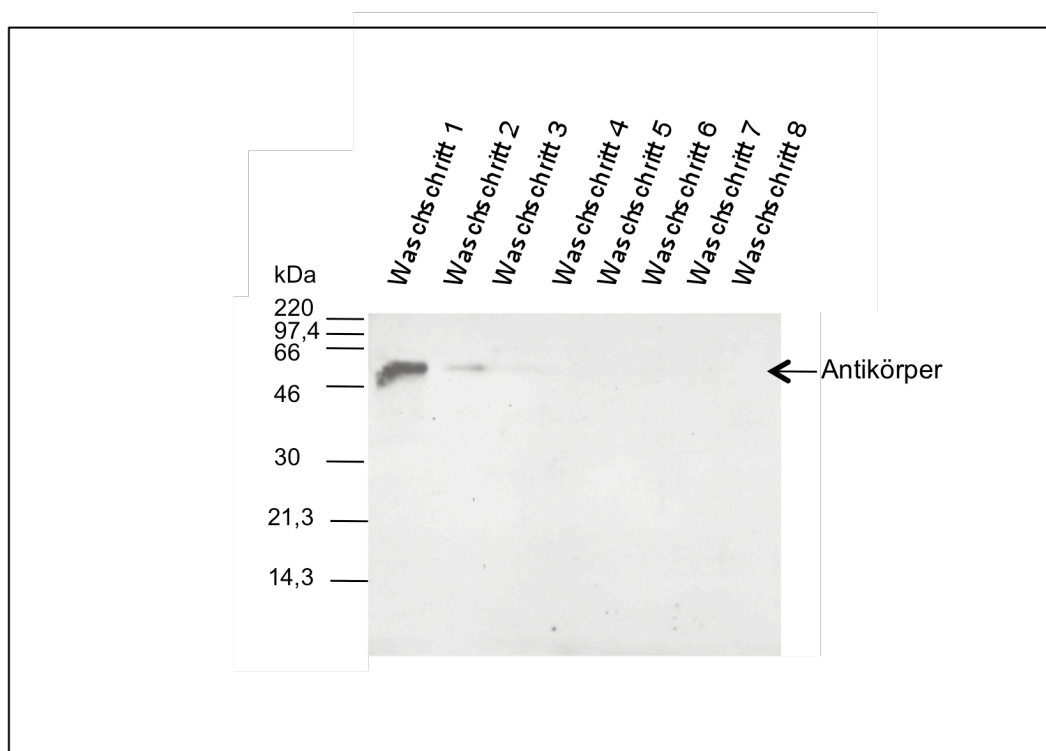


Abb. 3.5. Antikörperwaschschritte 1-8. Der Antikörper wird nach schon 3 Waschschritten komplett ausgewaschen, bis keine Bande mehr nachweisbar ist. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

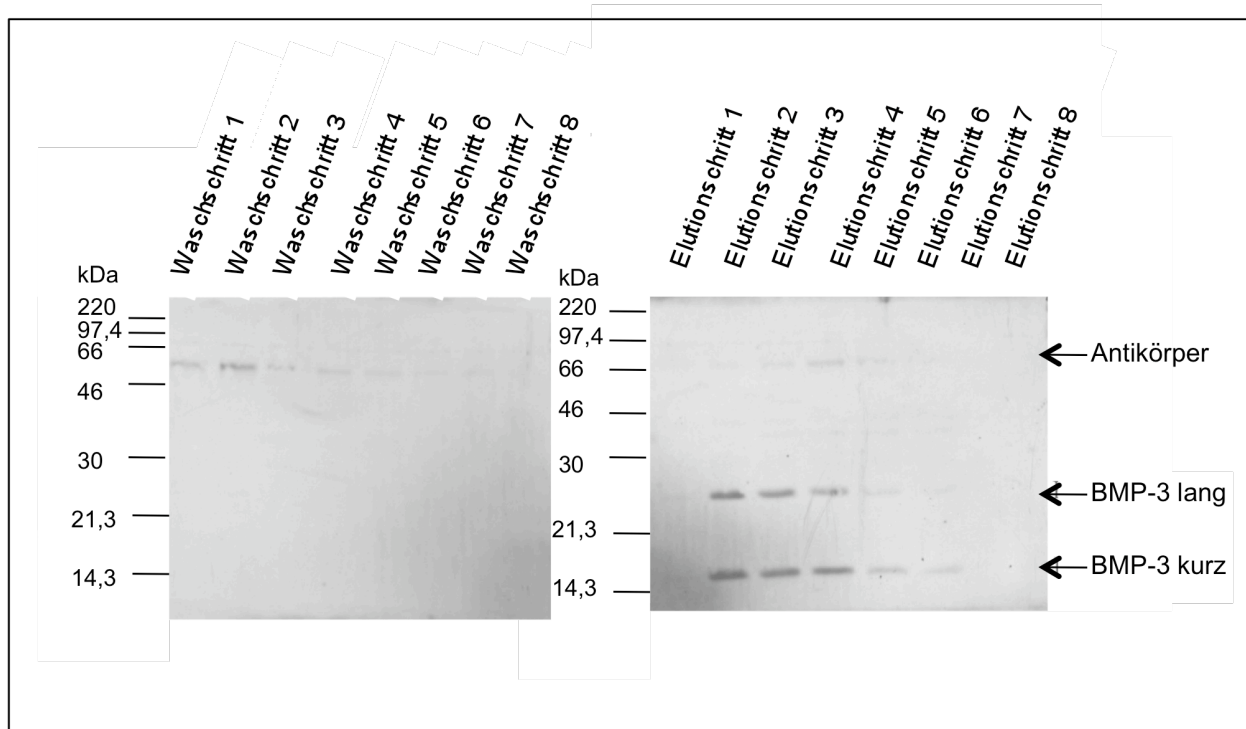


Abb. 3.6. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 2 μ g. BMP-3 hat komplett gebunden und lässt sich in den Schritten 2-5 gut eluieren, SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

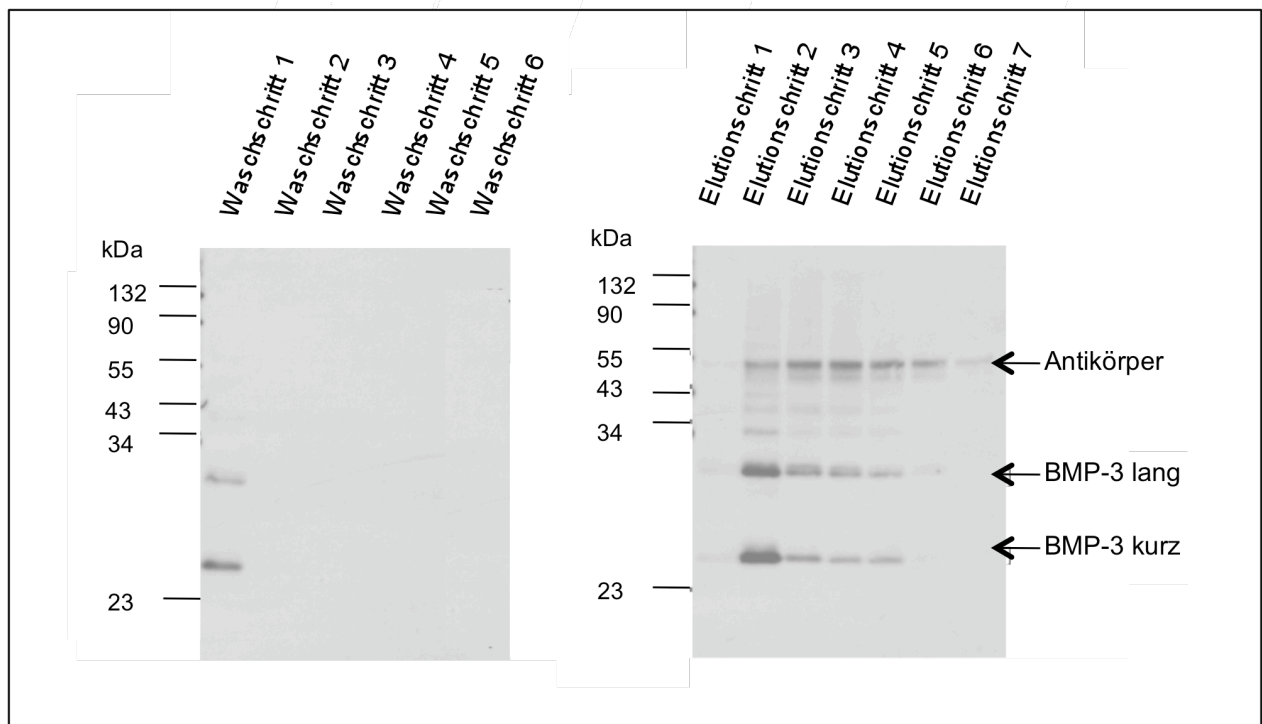


Abb. 3.7. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 2 μ g. Es erfolgt eine fast komplette Bindung des rekombinanten BMP-3 und man sieht vermehrt Antikörperverschleiss durch das saure Milieu der Elution. Gradientengel-Polyacrylamid 5-12%, Cruz-Marker®

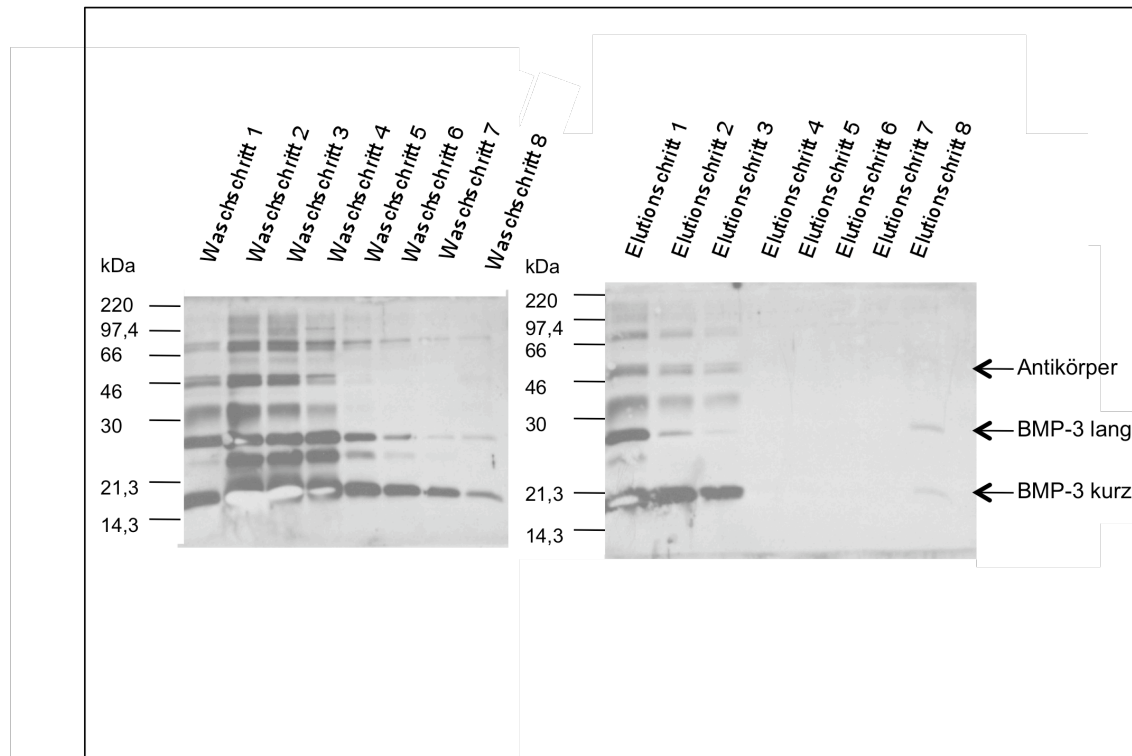


Abb. 3.8. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 20 µg. Die Säule ist mit Protein überladen. Viel ungekoppeltes BMP-3 wird ausgewaschen und geht verloren. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

In der Abbildung 3.5. sind die Waschschrirte der mit dem Antikörper beladenen Säule zu sehen. Es zeigt sich, dass überflüssiger und somit nicht gebundener Antikörper ausgewaschen wird und keine Rückstände im Westernblot bildet. Fünf Waschschrirte sind ausreichend, um den nicht gebundenen Antikörper komplett zu entfernen. Die restlichen Antikörper sind stabil an die Säule gebunden und diese können für die Gewinnung von BMP-3 benutzt werden.

In Abbildung 3.6. zeigt der Test des gekoppelten BMP-3 Antikörpers, dass die beiden rekombinanten, nicht glykosylierten BMP-3-Varianten hervorragend vom Antikörper erkannt und gebunden wurden. Dies kann man deutlich daran erkennen, dass nach den erfolgten Waschschrirten bei entsprechender Gesamtmenge (2x2 µg) keine Banden im Blot zu detektieren waren. Im Verlauf der Elutionsschrirte werden die BMP-3-Banden eindeutig sichtbar. Die Banden entsprechen jeweils einer Probe der aufgefangenen Fraktion von ca. 100 µl beim Eluieren. Es müssen ca. 5 Fraktionen aufgefangen werden, um das gesamte gebundene BMP-3 zu erhalten. Somit kann mit der Säule BMP-3 gebunden und mit Hilfe des Glycinpuffers eluiert werden.

Die Kapazität der Säule ist allerdings begrenzt. Dies ist in Abbildung 3.7. dargestellt, in der man erkennt, dass bei der größeren Auftragsmenge (2x20 µg) an BMP-3 deutlich mehr Waschschrirte nötig sind, um das ungebundene BMP-3 zu entfernen.

Es zeigen sich im Westernblot auch vermehrt Aggregationen des BMP-3, die nicht erwünscht sind.

Die Banden, die nicht genau den rekombinanten BMP-3-Varianten entsprechen, sind zum einen durch Degradation, zum anderen durch Aggregatbildung des rekombinanten BMP-3 zu erklären.

Aus diesen Ergebnissen zogen wir den Schluss, dass es möglich ist, mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie BMP-3 aus einer Probe aufzureinigen.

3.4.2. Zellkultur: Bestimmung der optimalen Zelldichte und Wachstumsdauer

Um eine möglichst große Menge an BMP-3 zu gewinnen, überprüften wir nun das Wachstumsverhalten der SK-BR-3-Zellen.

Die SK-BR-3-Zelllinie wurde 1970 von pleuralen Effusions-Zellen einer 43 Jahre alten Frau kultiviert. Sie stammt aus einem Adenokarzinom der Mamma. Die SK-BR-3-Zelllinie überexprimiert das HER2/c-erb-2 Gen-Produkt. Zytogenetische Analysen zeigen eine hypertriploide humane Zelllinie mit 84 Chromosomen in ca. 34% der Zellen. Zellen mit 80 Chromosomen sind in ca. 28% vorhanden. Die SK-BR-3-Zellen

zeigen insgesamt eine sehr komplexe Chromosomen-Komposition.

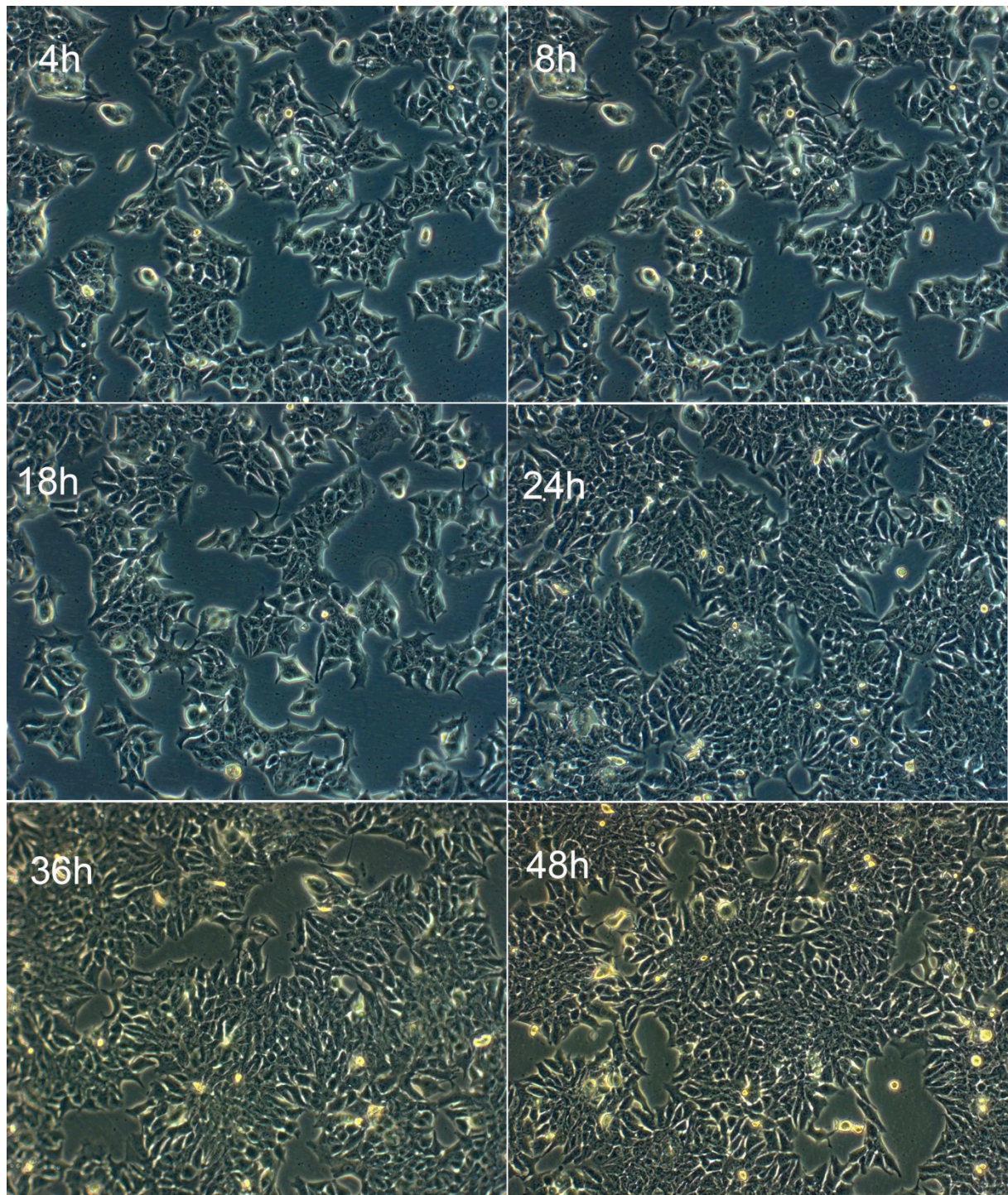


Abb. 3.9. Wachstumsverhalten der SK-BR-3-Zellen nach jeweils 4, 8, 18, 24, 36 und 48 Stunden. Nach 48 Stunden ist ein nahezu dichter Zellrasen erreicht.

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens unter serumfreien Bedingungen wurden 5×10^6 Zellen ausgesät. Die Aufnahmen in Abbildung 3.9. zeigen, dass bei adhärentem Wachstum der Zelllinie unter serumfreien Bedingungen nach 48 Stunden ein nahezu geschlossener Zellrasen vorhanden ist. Somit ist nach 48 Stunden der optimale Zeitpunkt (bei größter Zelldichte und noch intakten Zellen), den

Überstand zu entnehmen und unter dem Aspekt der BMP-3-Gewinnung weiter zu verarbeiten.

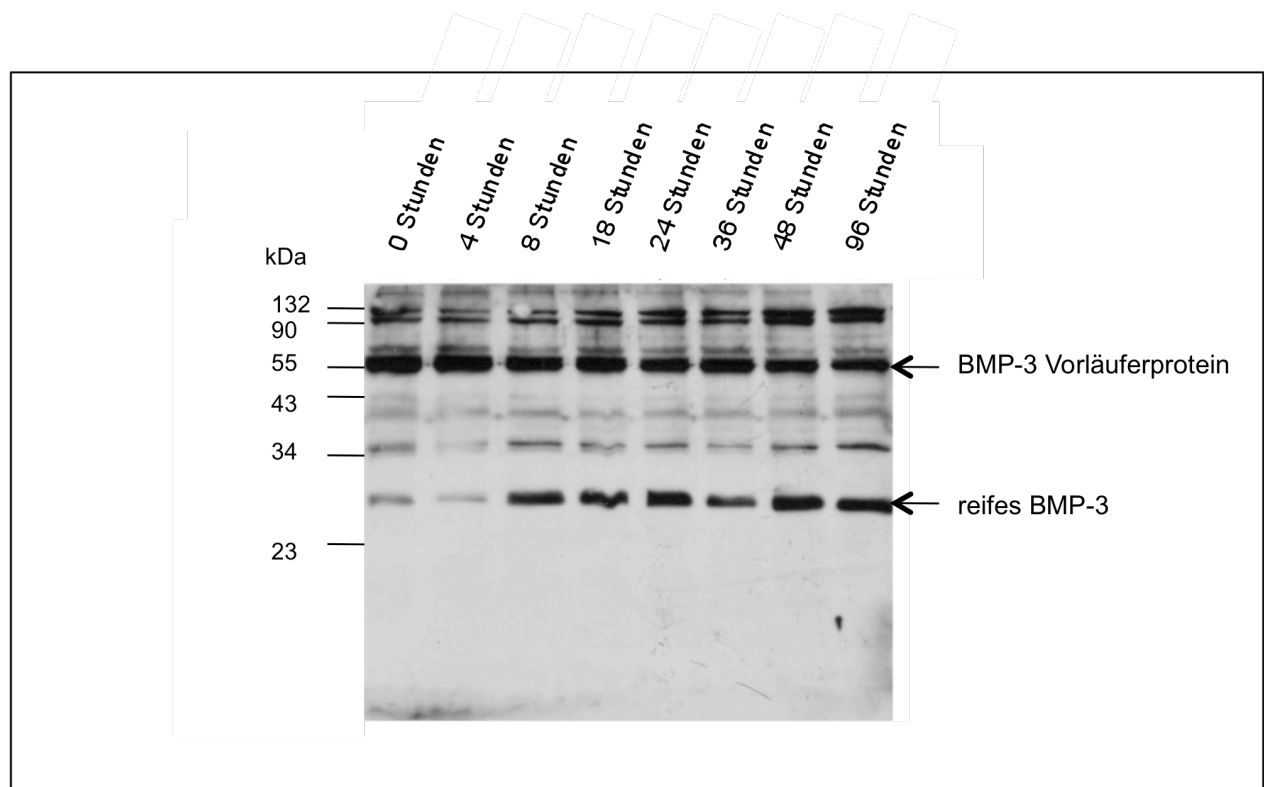


Abb. 3.10. Proteinlysate der serumfreien SK-BR-3-Zellen nach 0, 4, 8, 18, 24, 36, 48, 96 Stunden. Nach 48 Stunden ist ein maximales Ansteigen im reifen BMP-3 zu sehen. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Cruz-Marker®

In Abbildung 3.10. ist das Proteinlysate mit jeweils 50 µg aufgetragen, gewonnen nach den jeweils angegebenen Wachstumszeiten der Zellen in Medium ohne Serum. In diesem Blot kann man im Bereich der Bande von ca. 30 kDa, wo wir das BMP-3 vermuten, ein deutliches Ansteigen des Signals erkennen. Der optimale „Erntezeitpunkt“ für den SK-BR-Zellkultur-Überstand ist nach 48 Stunden.

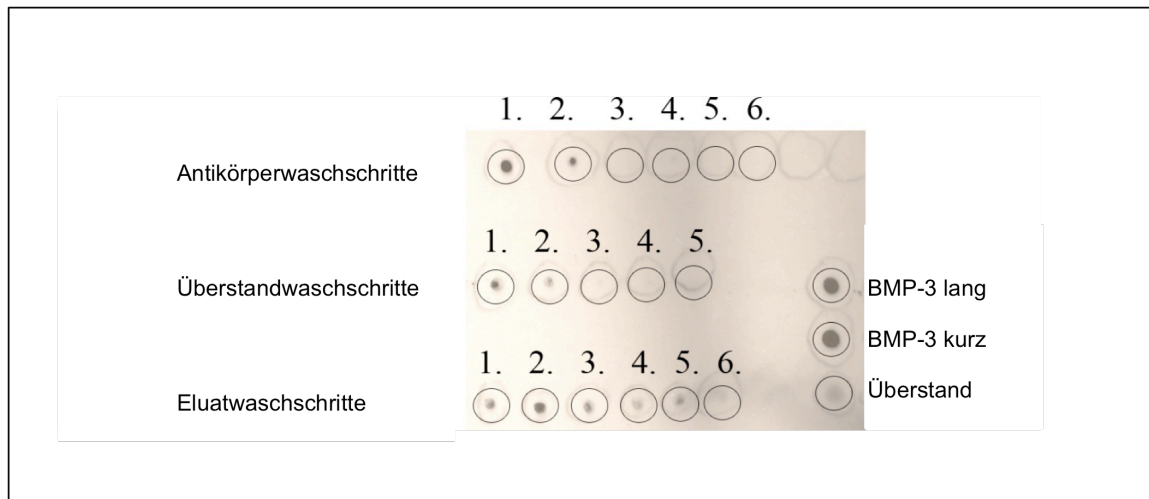


Abb. 3.11. Einzelne Schritte der Säule im Dot-Blot getestet. Man erkennt, dass in den einzelnen Schritten auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen jeweils BMP-3 vorhanden ist

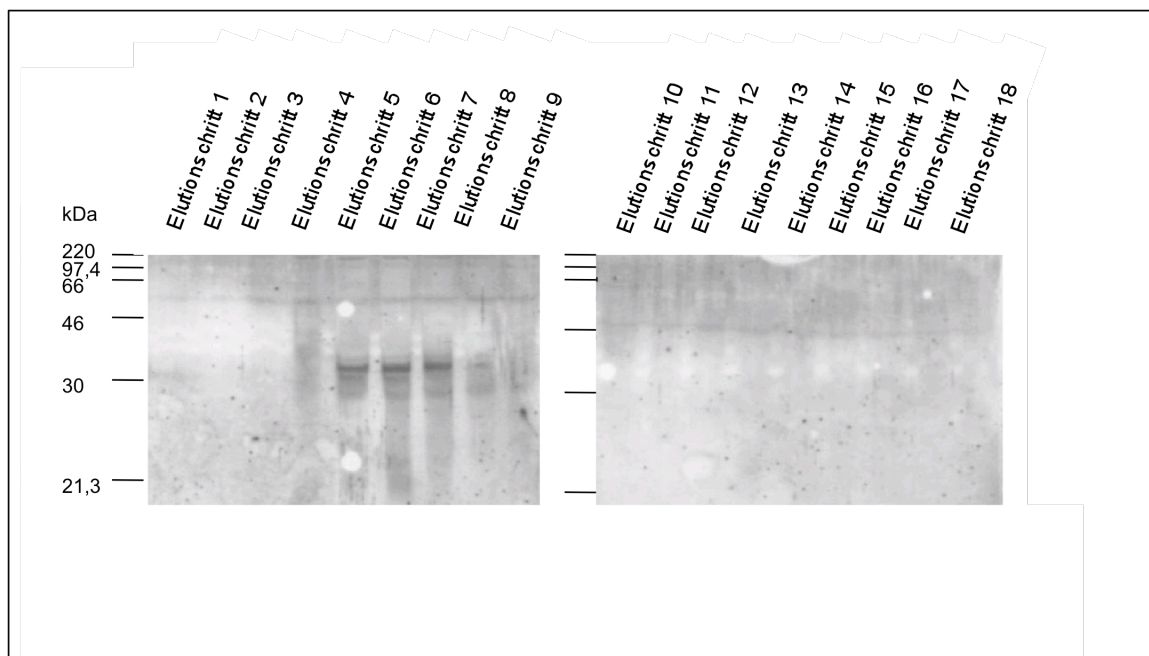


Abb. 3.12. Ermittlung, in welchen Fraktionen beim Kulturüberstandmedium das BMP-3 zu finden ist, Elutionsschritte 5-8 sind optimal. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

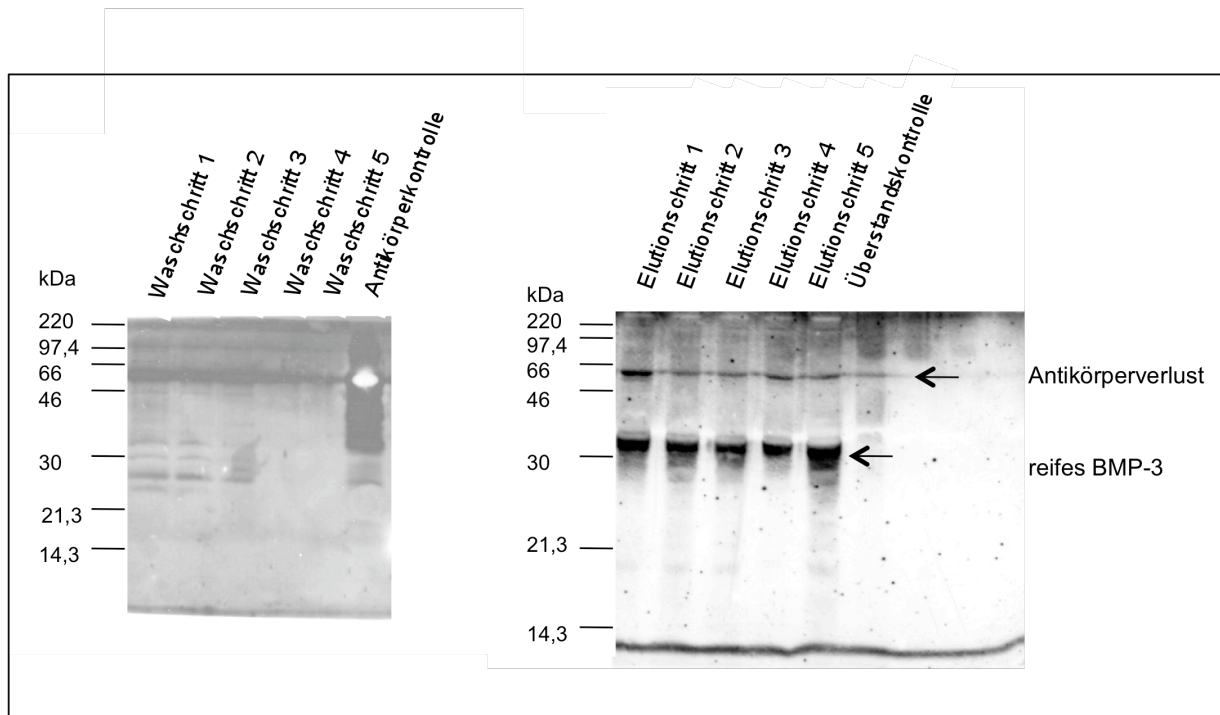


Abb. 3.13. Eluat aus 48 Stunden serumfreiem SK-BR-3-Kulturmediumüberstand. Es wurden die optimalen Eluatschritte aufgetragen. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Rainbow-Marker®

Wie in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben, wurde zur Gewinnung des Überstandes auf die adhärennten SK-BR-3-Zellen serumfreies Medium gegeben. Nach 48 Stunden wurde der gewonnene BMP-3-haltige Kulturüberstand unter sterilen Bedingungen entfernt und weiter verarbeitet.

In Abbildung 3.11. wurde das Verfahren getestet, indem die gewonnen Proben auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert wurden. Anschließend wurde diese wie ein normaler Westernblot behandelt und entwickelt. Man erkennt (wie schon in den Versuchen mit rekombinantem BMP-3), dass der nicht gebundene Antikörper bereits nach Waschschrift 2 komplett ausgewaschen wird und das nicht gebundene BMP-3 nach Waschschrift 2 nicht mehr zu detektieren ist. Damit befindet sich das BMP-3 gebunden am Antikörper in der Säule und kann optimal eluiert werden. Im Eluat findet sich dann wieder BMP-3.

In den dargestellten Westernblots (Abb. 3.12. und 3.13.) wurde das gleiche Prinzip angewandt. Nach der Antikörperbindung wurde der Kulturmediumüberstand hinzugegeben, fünfmal gewaschen und anschließend eluiert.

In Abbildung 3.12. wurde das gleiche Prinzip verwendet und überprüft, in welchen Elutionsfraktionen das BMP-3 optimal aufgefangen wird. Die ersten vier Fraktionen können verworfen werden, da sie kein BMP-3 enthalten. Dies liegt daran, dass die

Säule ein Volumen besitzt, welches der Elutionspuffer von oben nach unten durchdringen muss, bis das erste BMP-3 erfasst wird.

In Abbildung 3.13. erkennt man, dass fünf Waschschritte ausreichend sind, um ungebundenes Material zu entfernen. Hier sind die Elutionsfraktionen schon optimiert und enthalten alle BMP-3 im Bereich von ca. 30 kDa.

Wir konnten mit diesem Verfahren BMP-3 mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa gewinnen, welches wir jetzt genauer charakterisieren wollten.

3.5. Charakterisierung des gewonnenen BMP-3 über die biologische Aktivität

3.5.1. Deglykosylierung des gewonnen Eluats

Endoglykosidasen spalten Oligosaccharide an definierten Stellen. Die Endoglykosidasen F und H spalten die endständige Chitobiose-Einheit in bestimmten N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten, so dass noch ein Monosaccharidrest am Protein verbleibt. Für die Wirksamkeit einer Endoglykosidase ist die Anwesenheit ihrer Schnittstelle Voraussetzung, doch wird die Enzymaktivität zusätzlich bestimmt durch Konformation und Größe des Polypeptids und Zahl, Anordnung und Art der restlichen Zucker des Oligosaccharides. Mit nachfolgendem Experiment wollten wir überprüfen, ob die Banden unseres gewonnenen BMP-3 ohne mögliche Glykosylierungen einer der beiden Varianten des rekombinanten BMP-3 entsprechen. Zur genaueren Charakterisierung des gewonnen Eluats wurden die Proben mit der Endoglycosidase-H behandelt. Wir erwarteten eine Bande im Bereich der rekombinanten BMP-3-Proteine und hätten somit die Molekulargewichtsunterschiede zwischen dem isolierten nativen und dem rekombinanten BMP-3 erklären können.

Die Inkubationszeiten von BMP-3 aus dem Eluat und der Endoglykosidase-H betrugen 2, 8 und 24 Stunden. Danach wurde die Endoglykosidase-Reaktion gestoppt.

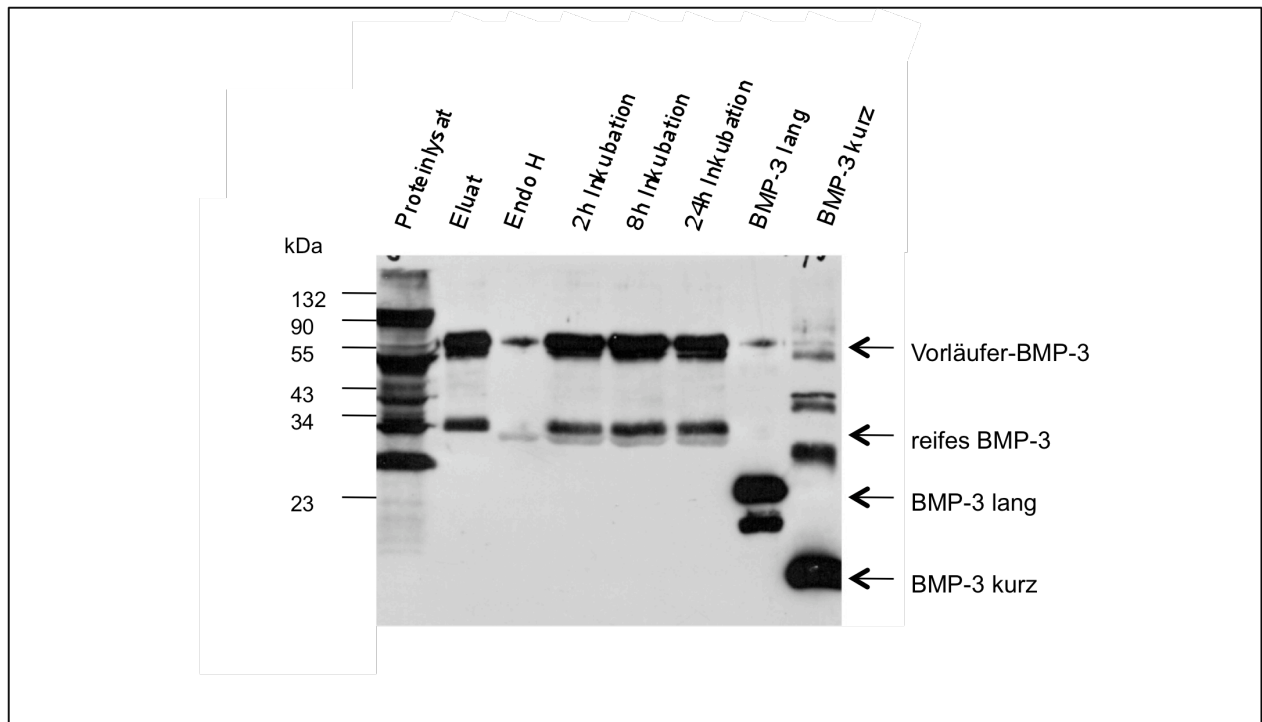


Abb. 3.14. Deglykosylierung des nativen BMP-3, Inkubationszeit mit Endoglykosidase-H und BMP-3 2h, 8h und 24h; Es zeigt sich kein Unterschied zum ursprünglichen Eluat. SDS Gel 12%, Cruz-Marker®

In Abbildung 3.14. sind die ersten drei Bahnen als Kontrolle aufgetragen. Im Proteinlys at zeigen sich die Banden der Vorläuferproteine von BMP-3 und aufgrund einer größeren Proteinmenge vermehrt unspezifische Banden. Das Eluat zeigt das Vorläufer BMP-3 bei ca. 60 kDa und das reife BMP-3 bei 30 kDa. Die Endoglykosidase-Kontrolle zeigt eine Bande bei ca. 32 kDa. Es ist eine unspezifische Bande, weil beim Beladen aus der Bahn mit der „2 Stunden Inkubation“ etwas in die „EndoH“ Bahn gelangt ist. Das mit der Endoglykosidase-H inkubierte BMP-3 zeigt in der Bandenintensität und -stärke bei 30 kDa und 60 kDa zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede zum ursprünglichen Eluat. Es zeigte sich keine Bande, die dem rekombinanten BMP-3 entsprach. Die zusätzlichen Banden beim langen BMP-3, die kleiner als 23 kDa sind, sind vermutlich Degradationsprodukte, da dieses thermodynamisch instabil ist. Beim kurzen BMP entsprechen die Banden, die größer als 16 kDa sind, Aggregaten.

Zusammenfassend kann man sagen, BMP-3 aus dem Eluat wurde entweder nicht deglykosyliert oder hat initial schon keine Glykosylierungen. Rekombinantes BMP-3 liegt unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamid als Monomer vor. Ein Monomer des BMP-3 darzustellen, gelang uns beim nativen BMP-3 nicht. Wir

suchten nun nach einer weiteren Möglichkeit, BMP-3 aufzureinigen, um das gewünschte monomere native BMP-3 aus den SK-BR-3-Zellen zu gewinnen.

3.5.2. Proteinaufreinigung mit Milliporefilter®

Die Aufreinigung mit dem Milliporefilter diente der genaueren Analyse des BMP-3 im Kulturmedium-Überstand und Proteinlysate, da der BMP-3-Antikörper in beiden Fällen Banden detektierte, die nicht genau zuzuordnen waren. Die Idee war, mittels Größenausschlusschromatographie zuerst den Überstand mit Hilfe eines Filters mit einem Cutt-off von 5 kDa aufzukonzentrieren, um keine Proteine zu verlieren. Anschließend erfolgte eine Trennung mit einem Filter mit einem Cutt off von 50 kDa. Diese Größe erschien uns sinnvoll, um die Vorläuferproteine des BMP-3, die alle größer als 50 kDa waren, vom nativen BMP-3 zu trennen. Dies führten wir zum einen nativ, zum anderen mit SDS durch. Das SDS diente dazu, die Proteine zu denaturieren und Aggregatbildung entgegenzuwirken.

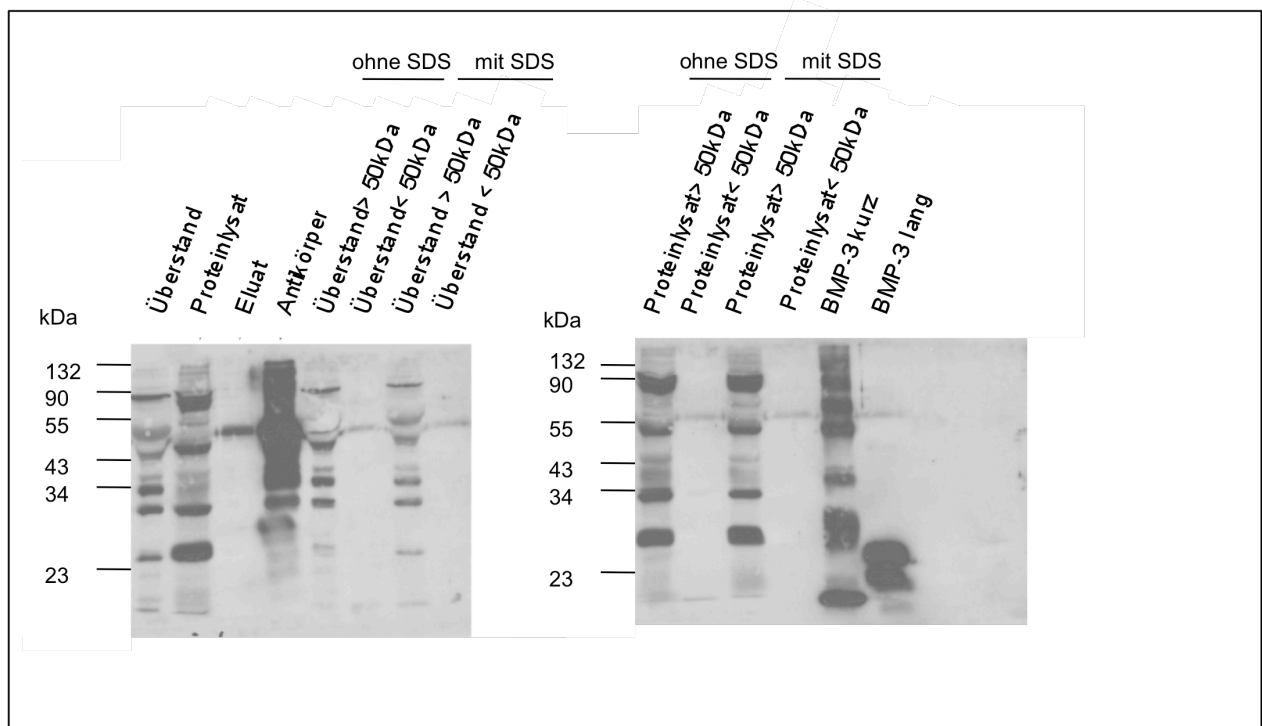


Abb. 3.15. Auftrag Proben aus Millipore-Aufreinigung. Es sind keine Unterschiede über die 50kDa Filter zu erkennen, >50 kDa= Proteine die größer als 50 kDa sind und über dem Filter konzentriert wurden, <50 kDa Proteine die kleiner als 50 kDa sind und filtriert wurden, SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Cruz-Marker®

Die verschiedenen Proben, die gewonnen wurden, sind auf das Gel in Abbildung 3.15. aufgetragen.

Als Kontrolle ist der aufkonzentrierte Überstand, das Proteinlysate, ein Eluat aus einer NHS-Sepharose Säule und der Antikörper aufgetragen. Die weiteren Banden zeigen den der oben beschriebenen Prozedur unterzogenen Überstand und das Proteinlysate.

Der Aufkonzentrationsschritt des Überstandes zeigt in der Bahn der Überstandkontrolle, dass mit dem Filter von 5 kDa eine Aufkonzentration stattgefunden hat, da hier im Gegensatz zum nicht-aufkonzentrierten Überstand Banden erkennbar sind. Wenn man die Fraktionen des Überstandes nach dem 50 kDa Filter betrachtet, sieht man, dass alle BMP-3-Proteine in der Fraktion von über 50 kDa „hängengeblieben“ sind, dies sowohl in der Fraktion mit und ohne SDS. Das gleiche Phänomen sieht man in den Fraktionen des Proteinlysates. Im Westernblot laufen diese Banden allerdings in den Fraktionen von unter 50 kDa. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Proteine in den Proben zu sehr zur Konglomeratbildung neigen und deshalb nicht durch die Porengröße des Filters von 50 kDa durchpassen. Der Zusatz von SDS kann dies nicht verhindern.

Zwischen der Bahn des Überstandes und des Proteinlysates sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Zum einen ist das Intensitätsverhältnis „gleicher“ Banden unterschiedlich, was auf eine unterschiedliche Mengenverteilung in beiden schließen lässt. Im Überstand sind deutlich identifizierbare Bande bei 32 kDa und 45 kDa.

Eine Aufreinigung von nativen BMP-3 lässt sich mit dieser Methode nicht erreichen. Deshalb versuchten wir, BMP-3 mit Hilfe von Protein-A-Sepharose zu isolieren.

3.5.3. Protein-A-Sepharose

Protein-A wurde als weitere Variante benutzt, um BMP-3 aus dem Überstand zu isolieren. Protein-A aus *Staphylococcus aureus* bindet Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne. 1 Mol Protein-A bindet 2 Mol IgG. Hohe Salzkonzentrationen und alkalische pH-Werte verstärken die Bindung zwischen dem Protein-A und dem Antikörper. Hierfür wurde der Antikörper ähnlich wie bei der NHS-Sepharose über Nacht mit der Protein-A-Sepharose inkubiert. Im Unterschied zur NHS-Sepharose wurde der Komplex dann in das Kulturmedium gegeben und anschließend abzentrifugiert, anstatt alles über eine Säule laufen zu lassen. Diese Methode hat den Vorteil einer langen Interaktionszeit zwischen Antigen und Antikörper. Durch diese erhofften wir uns eine größere Ausbeute an BMP-3.

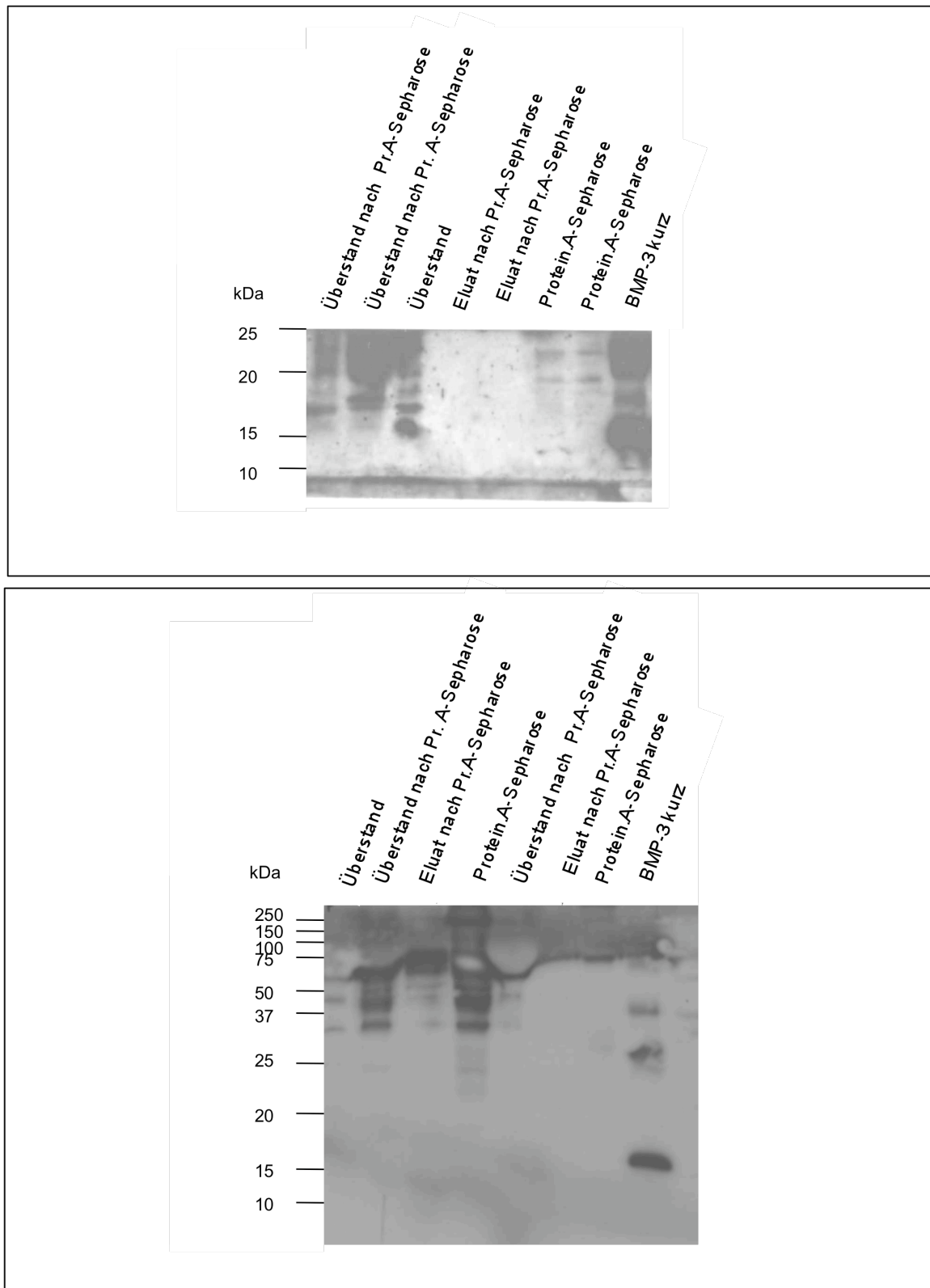


Abb. 3.16. Isolierung BMP-3 mit Protein-A-Sepharose. Eine Beurteilung des Western-Blots ist schwierig, aufgrund des starken Signals des bindenden Antikörpers im Eluat. SDS-Polyacrylamid-Gel 12%, Kaleidoscope-Marker®

In den obigen Abbildungen sind die verschiedenen Arbeitsschritte aufgetragen. Als Kontrolle ist der Überstand aufgetragen. Der „Überstand nach Protein-A-Sepharose“

stellt den Überstand dar, der nach der Bearbeitung mit Protein-A-Sepharose übrig bleibt. Zu erwarten wäre, dass ein schwächeres Signal der BMP-3-Banden zu sehen ist. Das Eluat zeigt in diesem Experiment (Abb. 3.16) leider keine eindeutige Bande. Dies kann als Ursache haben, dass das BMP-3 durch die experimentellen Bedingungen nicht vom Antikörper gelöst werden konnte und noch an der Protein-A-Sepharose hängt. In der aufgetragenen Protein-Sepharose, an der man dies sehen könnte, stellt sich dies durch die Interaktion mit dem Antikörper, der hier gebunden ist und viele unspezifische Banden in dieser Bahn zeigt, nicht eindeutig dar. Die Beurteilung der Banden fällt insgesamt schwer, da sich in jeder Probe auch der Antikörper befindet, der durch die denaturierenden Bedingungen von der Protein-A-Sepharose gelöst wurde und vom sekundären Antikörper im Rahmen der Entwicklung des Blots auch detektiert wird und so einen starken Hintergrund im Westernblot verursacht.

Das Material aus der Aufreinigung mit Protein-A-Sepharose und der Immunoaffinitätschromatographie wurde für die Testung der biologischen Aktivität weiter benutzt.

3.5.4. Alkalische Phosphatase-Inkubationsversuche

3.5.4.1. Inkubation mit SK-BR-3-konditioniertem Medium

Von BMP-2 ist bekannt, dass es die Entwicklung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten fördert. Dies geschieht über eine Aktivierung des ALK-1-Rezeptors. Des Weiteren ist in diesem Rahmen eine Induktion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität zu verzeichnen (Thies et al. 1992, Katagiri et al. 1994, Engstrand et al. 2000). Die BMP-induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase wird oft zum Nachweis für die BMP-induzierte Osteoblastendifferenzierung benutzt (Fujii et al. 1999).

So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bioassay im Mikrotiterplattenformat eingesetzt, um den Einfluss von BMP-3 auf die Alkalische Phosphatase Aktivität zu bestimmen. In unseren Experimenten wurde BMP-3 auf verschiedene Weise gewonnen, zum einem über die Säule, über Protein-A-Sepharose und durch SK-BR-3-inkubiertes Medium. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde durch rekombinantes BMP-2 induziert und beobachtet, welche Effekte in Kombination mit dem gewonnenen BMP-3 zu verzeichnen sind.

Man kann in diesen Versuchen zum einen die Kinetik, also das Ansteigen des Farbumschlages, bestimmen, zum anderen einen definierten Endpunkt nach 15 min. Die Kinetik ist zwar aussagekräftiger, ließ sich aber bei manchen Versuchen, wenn der Farbumschlag zu langsam war, nicht gut anwenden und so wurde dann der Endpunkt dargestellt.

In unseren Versuchen setzten wir initial unglykosyliertes BMP-2 ein, später aufgrund der Verfügbarkeit und deutlich besseren Induktion glykosyliertes BMP-2, beide freundlicherweise von Dr. Peter Hortschansky zu Verfügung gestellt, ein.

Als erste Probe verwendeten wir den gewonnenen Kulturüberstand (kDMEM), der anschließend aufkonzentriert wurde.

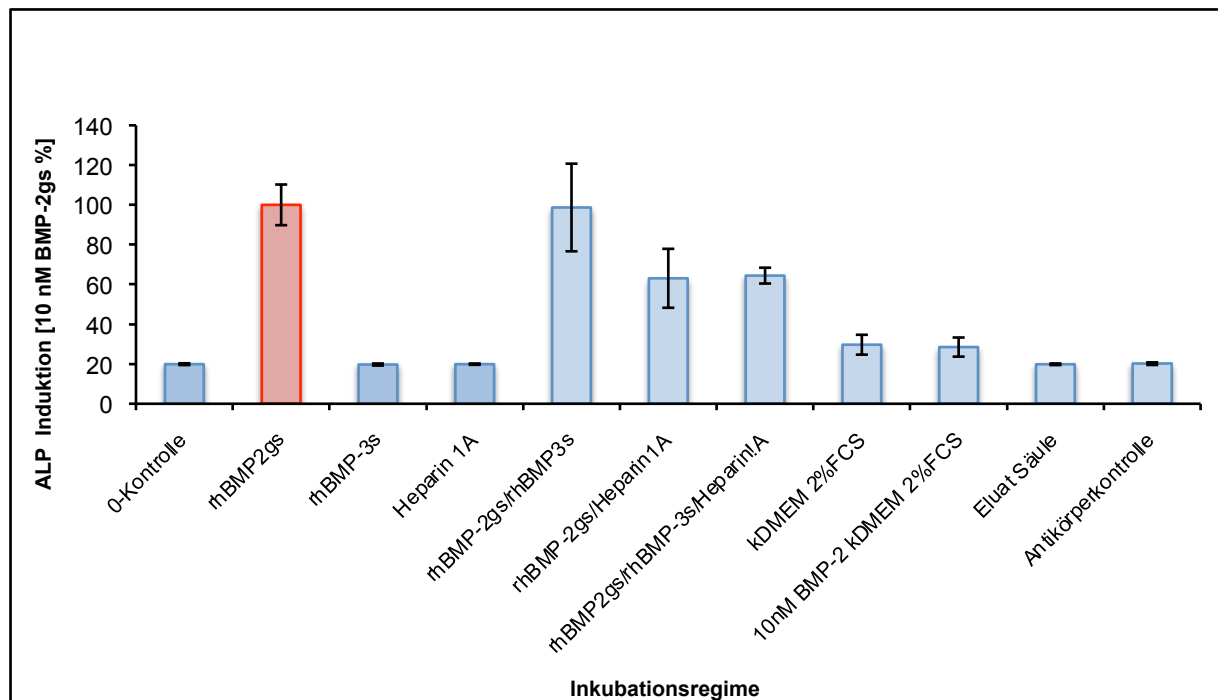


Abb. 3.17. Inkubation von C2C12-Zellen mit 48 Stunden konditioniertem SK-BR-3-Medium, Endpunkt 15 min. rot: unglykosyliertes BMP-2 als Kontrolle, dunkelblau: Kontrollen, hellblau Probenkombinationen; rhBMP-2 gs: unglykosyliertes BMP-2, rh BMP-3s: BMP-3 kurz, kDMEM: konditioniertes DMEM; y-Achse: ALP-Induktion, x-Achse: Inkubationsregime

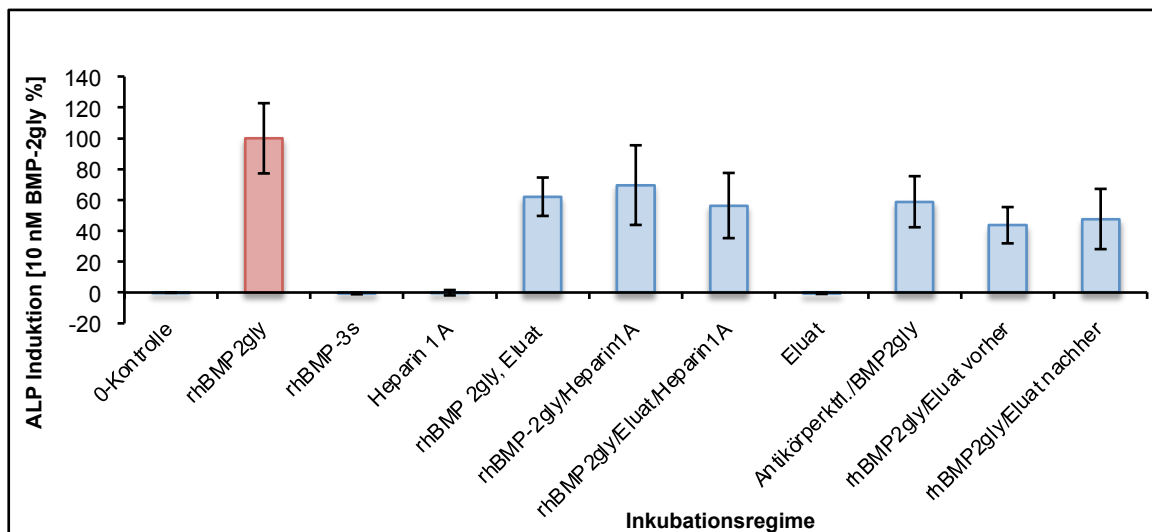
In Abbildung 3.17. sind die Kontrollen (0-Kontrolle, rekombinantes BMP-2gs, rekombinantes BMP-3s, Heparin 1A, Eluat Säule, Antikörperkontrolle) in den ersten vier und den letzten zwei Bahnen dargestellt. Nur von der BMP-2 Kontrolle ist eine Aktivierung der ALP zu erwarten. Man erkennt, dass nur das unglykosylierte BMP-2 (BMP-2gs), welches die unglykosylierte Variante des rekombinanten BMP-2 darstellt, die Alkalische Phosphatase induziert. Die Kontrollen zeigen keine Induktion der ALP. Das rekombinante BMP-3 kurz in Kombination mit BMP-2 zeigt keine Hemmung der ALP. Die Hinzugabe von Heparin zum BMP-2 mit oder ohne rekombinantes BMP-3 zeigt eine Reduktion der Induktion. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Heparin eine höhere Affinität zu BMP-2 in der Extrazellulärmatrix hat. Somit steht weniger BMP-2 für die Bindung an die Rezeptoren zur Verfügung. Das konditionierte Medium allein zeigt keine wesentliche Induktion der ALP. In der Kombination mit dem BMP-2 zeigt sich eine eindeutige Reduktion der ALP-Induktion im Vergleich zur BMP-2-Kontrolle. Die Ergebnisse in diesem Experiment zeigen, dass das eingesetzte BMP-2 in Kombination mit dem SK-BR-3-konditionierten Medium eine Hemmung der BMP-2-Wirkung zeigt. Anhand dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass der konditionierte SK-BR-3-Kulturüberstand mit Hilfe des über 48 Stunden exprimierten und in das Medium sezernierten BMP-3 einen insgesamt hemmenden Effekt auf die

Induktion der Alkalischen Phosphatase bewirkt. Dies wird in diesem Versuch nur indirekt nachgewiesen, da die Zusammensetzung des Kulturüberstandes viele verschiedene Proteine enthält, die auch einen Einfluß auf das BMP-2 haben können. Um den Effekt nun genauer dem BMP-3 zuschreiben zu können, setzten wir unser isoliertes BMP aus der Immunoaffinitätschromatographie ein.

3.5.4.2. Inkubation mit Säulen-Eluat aus der Immunoaffinitätschromatographie

Nachfolgend sind die Ergebnisse des Alkalischen Phosphatase-Assays mit den BMP-3-Proben aus der Immunoaffinitätschromatographie dargestellt. Hier wurde das inzwischen verfügbare rekombinante glykosylierte BMP-2 (BMP-2gly) benutzt, da dies eine bessere Induktion der ALP zeigt und somit Unterschiede in der Induktion besser zu sehen sind.

A



B

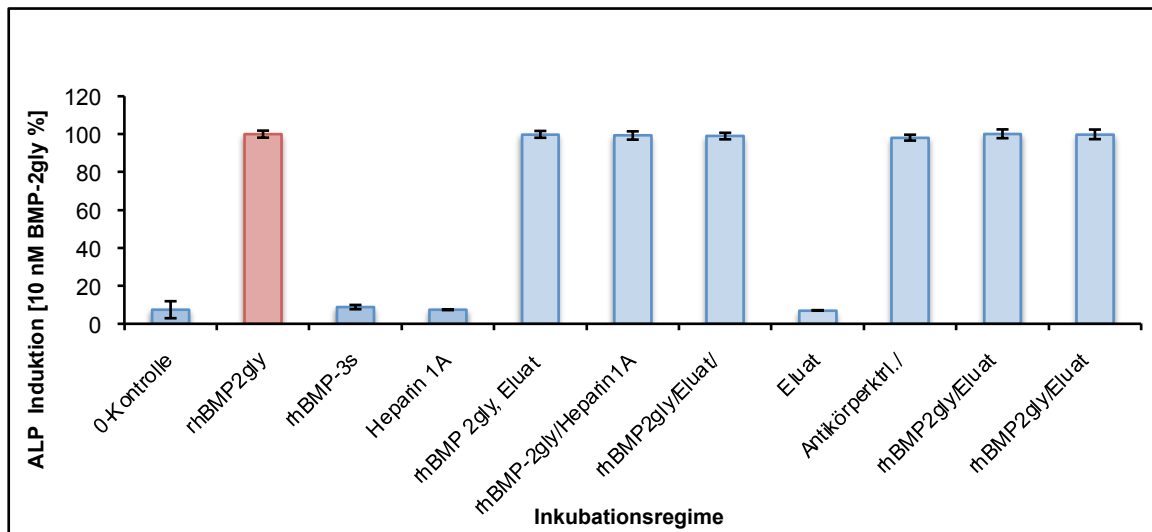


Abb. 3.18. Inkubation mit rekombinantem glykosylierten BMP-2 und dem gewonnenen Eluat, Medium jeweils vor und nach dem Eluieren. A: Kinetik 15 min, B: Endpunkt 15 min, rot: glykosyliertes BMP-2 als Kontrolle, dunkelblau: Kontrollen, hellblau Probenkombinationen; rhBMP-2 gly: glykosyliertes BMP-2, rh BMP-3s: BMP-3 kurz; y-Achse: ALP-Induktion, x-Achse: Inkubationsregime

In Abbildung 3.18. sind die Ergebnisse des Alkalische Phosphatase-Assays dargestellt. In der Abbildung A sieht man die Kinetik und in der Abbildung B die Endpunktbestimmung nach 15 min. Die Unterschiede in der Induktion der ALP sind in der Kinetik wesentlich besser zu sehen, da nach dem definierten Endpunkt von 15 min bei den induzierten Proben der Farbumschlag nahezu komplett ist und es somit aussieht, als sei die Induktion in den Proben mit BMP-2 gleich.

Deshalb beziehe ich mich im Wesentlichen auf Abbildung A. Zum einen sind die gewonnenen Proben mit den oben angegebenen Substanzen inkubiert worden. Die Kontrollen sind die 0-Kontrolle, das glykosylierte BMP-2, das kurze rekombinante BMP-3, Heparin und das Eluat, von denen nur das BMP-2 eine Induktion der ALP zeigt. Die Antikörperkontrolle mit BMP-2 zeigt eine Reduktion der ALP.

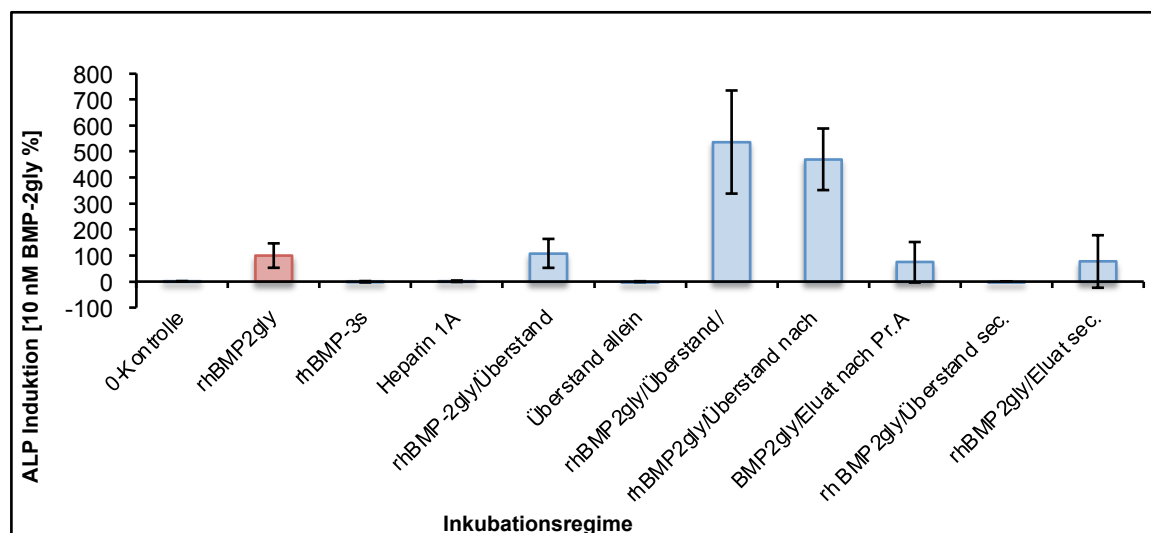
Die Kombination von rekombinantem BMP-2 mit dem Eluat zeigt eine deutliche Hemmung der Alkalischen Phosphatase-Induktion. Die Effekte lassen sich auch in den Proben, die vor und nach Elution gewonnen und dann mit BMP-2 kombiniert wurden (in den letzten beiden Balken dargestellt), nachweisen. Die Probe vor Elution zeigt eine stärkere Hemmung als die Probe nach Elution, welches man durch den Entzug von BMP-3 während der Immunoaffinitätschromatographie erklären könnte. Die Ergebnisse zeigen allerdings nur einen Trend, zumal die Kontrolle mit dem

Antikörper und mit dem Heparin auch eine Reduktion der ALP zeigt und somit die gesehenen Effekte unspezifischer Natur sein könnten. Somit setzten wir im nächsten Schritt das BMP-3 aus der Isolation mit der Protein-A-Sepharose ein.

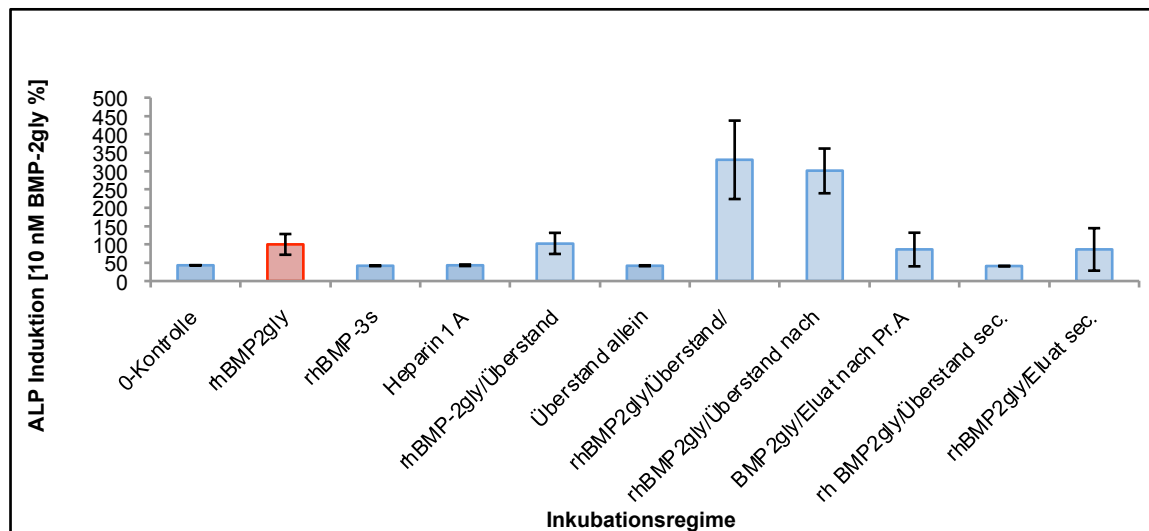
3.5.4.3. Inkubation von C2C12-Zellen mit BMP (E.coli) und Eluat aus Protein-A-Sepharose-Aufreinigung

In diesem Versuchsansatz wurde das Eluat aus den Experimenten mit der Protein-A-Sepharose eingesetzt. Als Positivkontrolle und Induktor der ALP diente wieder das rekombinante glykosylierte BMP-2. Aufgrund des glykosylierten BMP-2 erfolgte eine wesentlich schnellere Farbzunahme, da die ALP stärker induziert wurde. Die Kinetik ließ sich somit besser verwerten.

A



B



C

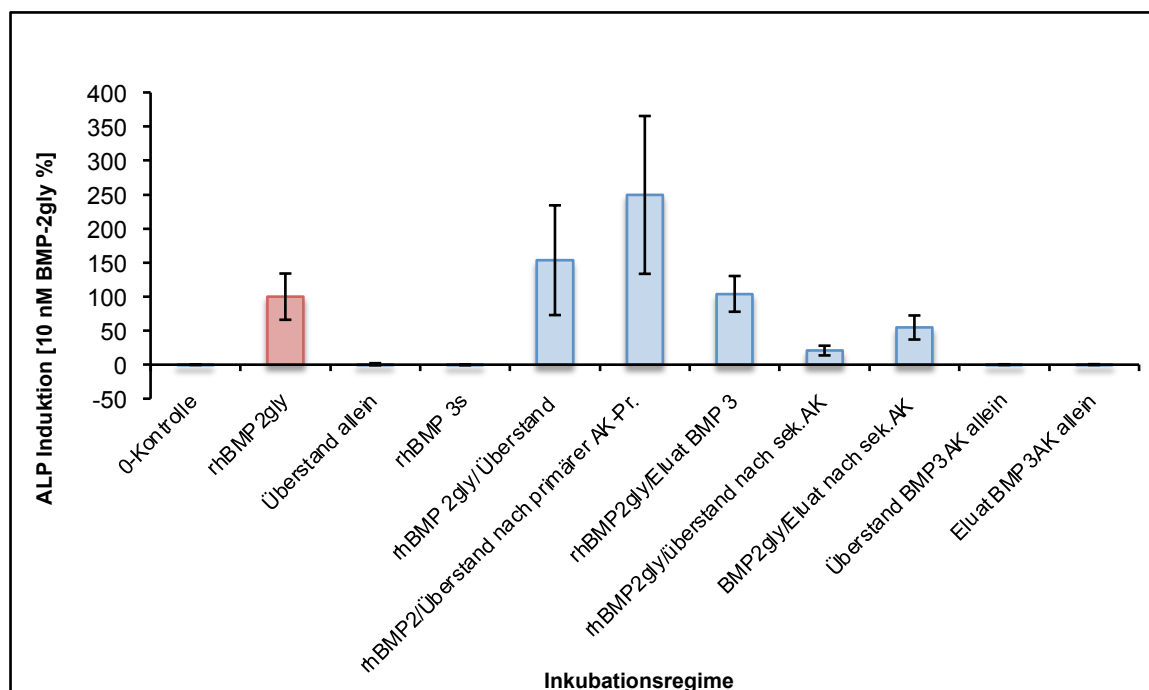


Abb. 3.19. Inkubation von C2C12-Zellen mit rekombinanten BMP-2, konditioniertem Medium von SK-BR-3 48 h und aus Protein-A-Sepharose gewonnenen BMP-3 und anderen Proben FCS 10 mM NaHCO₃ A: Kinetik B: Endpunkt C: Kinetik, rot: glykosyliertes BMP-2 als Kontrolle, dunkelblau: Kontrollen, hellblau Probenkombinationen; rhBMP-2 gly: glykosyliertes BMP-2, rh BMP-3s: BMP-3 kurz; y-Achse: ALP-Induktion, x-Achse: Inkubationsregime

In Abb. 3.19. A und B wurde der aufkonzentrierte Überstand mit verschiedenen Kombinationen von Reagenzien im Alkalischen Phosphatase-Assay verwendet. Die

ersten 4 Balken (0-Kontrolle, rhBMP-2gly, rhBMP-3s, Heparin 1A) stellen die Kontrollen dar. BMP-2 zeigt eine Induktion der ALP. Die restlichen Kontrollen zeigen keine Induktion und liegen somit im Bereich der 0-Kontrolle. BMP-2 in Kombination mit dem Überstand zeigt ebenfalls eine Induktion, die im Bereich des alleinigen BMP-2 liegt. Das BMP-2 mit dem zugesetzten Überstand und Heparin zeigt eine Verstärkung der Induktion. Der Überstand, der nach der Behandlung mit der Protein-A-Sepharose mit BMP-2 kombiniert wird, zeigt in dieser Kombination eine deutliche Verstärkung der Induktion im Vergleich zum Balken von der Kombination mit dem unbehandelten Überstand und dem BMP-2. Dies lässt darauf schließen, dass hemmende Faktoren, in unserem Fall das BMP-3, aus dem Überstand entfernt wurden und BMP-2 eine starke Induktion der ALP verursachen kann. Das gewonnene Eluat aus der Protein-A-Sepharose zeigt keine signifikante Hemmung des BMP-2.

In der Abbildung 3.19. C werden diese Ergebnisse bestätigt. Man sieht, dass der Überstand in Kombination mit dem glykosylierten BMP-2 die Alkalische Phosphatase-Induktion verstärkt, dass aber nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, der das BMP-3 entfernt, die Induktion noch wesentlich stärker ist. Um Antikörper-Effekte auszuschließen, wurde ebenfalls mit dem primären und sekundären Antikörper inkubiert, was keine wesentlichen Effekte auf die Wirkung des BMP-2 zeigte.

Aus diesen Experimenten kann man schließen, dass das von uns gewonnene BMP-3 in den ALP-Versuchen direkt keinen Einfluss auf die Induktionswirkung des BMP-2 hat. Indirekt konnte man jedoch sehen, dass eine Verstärkung der ALP-Aktivität immer nach dem Entzug von BMP-3 zu beobachten war. Dies deutet auf die regulierende Wirkung vom BMP-3 in Bezug auf BMP-2 hin.

4.0. Diskussion

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Um in Zukunft noch individuellere Therapiekonzepte verfolgen zu können, werden weitere tumorbiologische Prognosefaktoren gesucht. Hierbei werden weit über 100 potenzielle Indikatoren für den klinischen Einsatz diskutiert. Die Knochenmorphogenesefaktoren sind eine Gruppe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und zählen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu der großen Familie der TGF- β s. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Knochenentwicklung (Urist 1965), sondern auch in verschiedenen anderen Geweben. Die Mitglieder der BMP-Familie sind für die Regulation diverser Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Morphogenese mit verantwortlich (Hogan 1996). Bei der Vielzahl an Funktionen im menschlichen Organismus ist es nicht verwunderlich, dass BMPs auch im Rahmen von Tumorentstehung und -progression eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass die BMPs in verschiedenen Tumorgeweben exprimiert werden. Veränderungen konnten sowohl in epithelialen Tumoren (Brust (Clement et al. 2000), Lunge (Langenfeld et al. 2003), Prostata (Raida et al. 1999)) als auch in mesenchymalen Tumorgeweben (Niere, Knochen (Maliakal et al. 1994, Knittel et al. 1997)) beobachtet werden. Untersuchungen in verschiedenen Tumoren zeigten, dass auf mRNA-Ebene in den meisten Fällen eine Hochregulation der BMP-Expression besteht. Eine Ausnahme bildet BMP-7, welches kontroverse Resultate in Prostata-Tumoren und Nephroblastomen zeigt (Harris et al. 1994). Hinsichtlich des BMP-2 gibt es ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen. Es gibt Untersuchungen, die eine Hochregulation der BMP-2 Expression auf mRNA Ebene mittels RT-PCR im Gewebe zeigen. Auf der anderen Seite gibt es quantitative Gen-Expressions-Analysen, die eine negative Regulation von BMP-2 in Brustkrebsmetastasen im Vergleich zum normalen Brustgewebe zeigen (Arnold et al. 1999, Raida et al. 2005).

Die BMPs als Mitglieder der TGF-Familie stellen eine große Familie von Signalmolekülen dar, von der auf der einen Seite viele Funktionen bereits bekannt, auf der anderen Seite viele unbekannt sind. Es gibt insgesamt mehr als 30 TGF- β -artige Proteine im Menschen. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen, die TGF- β /Activin und BMP-Familien. Sie verwenden verschiedene Typen von R-SMADs, dabei stellt SMAD-4 immer das Co-SMAD dar. Zusätzlich gibt es noch inhibitorische SMADs (I-Smads) wie SMAD-6 und SMAD-7. Dazu kommen inhibitorische Liganden

wie Inhibin und möglicherweise BMP-3. Die Signaltransduktionskaskade wird durch Bindung dieser Liganden an die Membranrezeptoren mit intrinsischer Serin/Threonin Kinaseaktivität ausgelöst. BMPs binden dabei mit einer schwachen Affinität an die BMPR-I- und II-Rezeptoren, aber mit großer Affinität an den BMPR-I/II heterodimeren Rezeptorkomplex. Durch den heterodimeren Komplex wird die Serin/Threonin-Kinaseaktivität, die mit dem BMPR-II assoziiert ist, ausgelöst. Diese phosphoryliert den BMPR-I-Rezeptor in seiner GS-Domäne. Durch den aktivierten BMPR-I-Rezeptor werden die R-Smads phosphoryliert. Es kommt zur transienten Assoziation mit zytoplasmatischen Effektor-Proteinen, den R-Smads, welche nach Phosphorylierung vom Rezeptor dissoziieren, um mit Smad-4 hetero-oligomere Komplexe zu bilden. Diese können in den Nukleus translozieren und dort direkt mit transkriptionalen Partnern an spezifische Sequenzen in den Promoter-Regionen von BMP-Ziel-Genen die Transkription regulieren. I-Smads können das BMP-Signal hemmen.

Die BMPs erzielen ihre Wirkung über die Konzentration. Als Morphogene wirken sie über Konzentrationsgradienten, wobei sie über parakrine und autokrine Zellaktivierung zur Signalweiterleitung führen. Die Wirkungsdauer ist dabei in der Regel nur kurz. Auch in Tumoren, in denen BMPs exprimiert werden, kommt es zu konzentrationsabhängigen Effekten der BMPs.

Ein beträchtlicher Teil der im menschlichen Organismus vorkommenden Proteine ist bis heute nicht oder nur über die biologische Aktivität charakterisiert. Dabei stellt das BMP-3 und seine biologische Funktion noch ein nahezu unerforschtes Mitglied der TGF-Familie dar. BMP-3 ist im demineralisierten Knochen das BMP mit dem größten Anteil der BMPs, sprich mit über 60% vorhanden, was eine wichtige Rolle in der Homöostase des Knochens nahelegt (Luyten et al. 1989). In vitro-Studien konnten zeigen, dass BMP-3 die osteoinduktive Wirkung von BMP-2 antagonisieren kann (Wozney et al. 1988, Daluiski et al. 2001, Hino et al. 2004, Gamer et al. 2005). Ein weiterer Hinweis auf die regulierende Wirkung der Knochendichte bzw. antagonistische Wirkung in Bezug auf das BMP-2 zeigt sich in Experimenten mit Mäusen, bei denen die homozygot BMP-3-defizienten Mäuse eine höhere Knochendichte als die Wild-Typen zeigten. Die Ursache ist unklar. Die Zahl der Osteoklasten ist nicht beeinflusst. Man vermutet aber, dass der Verlust an BMP-3 die Osteoklasten-Funktion stimuliert. Ebenso wurden geringe Wirkungen auf die Osteoklasten-Proliferation und Differenzierung beobachtet. Es scheint so, als ob

BMP-3 die gleichen Effekte auf Osteoklasten hat wie für TGF- β in vitro und in vivo gezeigt (Filvaroff et al. 1999, Li et al. 2000, Daluiski et al. 2001). Die antagonistische Wirkung des BMP-3 wird mit der Induktion der Signaltransduktion über den TGF- β /Activin-Signalweg und der damit verbundenen Konkurrenz um intrazelluläre Signalmoleküle des BMP-Signalnetzwerkes in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutanten von BMP-3 unterschiedliche Bindungsaffinität zum ActII-R- und ActR-IIB-Rezeptor haben. Eine Lysin-30-Mutation zeigt eine wesentlich stärkere Bindung an den ActR-IIB-Rezeptor (George et al. 2007).

BMP-3 ist ein Faktor in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* (Krallenfrosch), der sowohl das BMP- als auch das Activin-Signal behindert. Dies funktioniert über eine Bindung an ActR-IIB, den normalen Typ-II-Rezeptor für dieses Protein. Sobald BMP-3 an ActR-IIB gebunden hat, kann es von den eigentlichen Liganden nicht verdrängt werden und somit ist die Möglichkeit der Aktivierung der R-Smads und der Signalweitergabe nicht mehr gegeben. Dies lässt vermuten, dass BMP-3 zur Feinmodulation der Signalkaskade dient (Gamer et al. 2005).

BMP-3 fördert in der Embryogenese die Dorsalisierung von *Xenopus laevis*. BMP-3 antagonisiert BMP-2 unabhängig von BMP-2 Rezeptoren. Es aktiviert die Expression von TGF- β -abhängigen Reportern und potenziert die Möglichkeit der Expression von Activin-Rezeptoren von TGF- β /Activin-Reportern (Bahamonde und Lyons 2001). Rekombinantes BMP-3 zeigte bisher keinerlei biologische Aktivität und so ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar, welche Rolle BMP-3 in der TGF- β -Familie spielt (Takao et al. 1996). Der Grund für die Aktivitätslosigkeit ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass das rekombinante BMP-3 entweder nicht richtig prozessiert oder gefaltet wird, oder beides. Eine andere Erklärung wäre die schlechte Affinität von BMP-3 zum ActR-II-Rezeptor. Von George et. al konnte gezeigt werden, dass der BMP-3 Wildtyp keine signifikante Erhöhung des ALP-Signals in C2C12-Zellen zeigt. Verschiedene Mutanten konnten zwar eine erhöhte Affinität zeigen, dies korrelierte aber nicht mit einer erhöhten Signalaktivität. Eventuell sind noch unbekannte Co-Rezeptoren an der Zell-Oberfläche nötig (George et al. 2007).

Die Funktion des BMP-3 ist somit noch nicht abschließend geklärt. Die Frage, die sich sicher nicht Shakespeare, sondern Daluiski im Jahr 2001 stellten, „BMP-3, to be or not to be a BMP“, konnte noch nicht beantwortet werden. Man geht davon aus, dass BMP-3 letztendlich eine essentielle Rolle als Modulator der osteogen aktiven

BMPs spielt (Bahamonde und Lyons 2001), dies sowohl in der Knochenmorphogenese als auch in der Embryogenese. Zusammengefasst vermutet man, dass BMP-3 ein direkter Rezeptor-Antagonist ist und so die Signalkaskade der anderen BMPs blockiert. Ein anderer Weg, der diskutiert wird, ist die Heterodimerbildung mit anderen BMPs und Activinen, um so dominant negative Liganden zu bilden (Hino et al. 2003, Gamer et al. 2005). Beides erscheint möglich.

So stand zu Beginn dieser Arbeit im Vordergrund, ein geeignetes System zu finden, um BMP-3 in nativer Form zu gewinnen, dabei aber kein Transfektionssystem zu benutzen. Mit Hilfe dieses Systems sollte das dann gewonnene BMP-3 näher untersucht werden, um weitere Erkenntnisse über die biologische Aktivität zu erlangen.

Zur Gewinnung des nativen BMP-3 standen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Man kann Proteine u.a. nach Größenunterschieden, nach Ladungsunterschieden, nach hydrophoben Wechselwirkungen und nach Affinität zu einem Liganden trennen. Ein gebräuchliches Verfahren stellt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) dar. Die HPLC erlaubt eine Aufreinigung von Proteinen, die nur in geringsten Mengen vorkommen. Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet, die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität. Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane, welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert sind, mit einem Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt. Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Es lassen sich mit der HPLC hohe Reinheiten erzielen. Nachteile des Verfahrens sind aber der hohe Lösemittelverbrauch, die schlechte Ausnutzung der stationären Phase, die Verdünnung der Fraktionen und bei niedrigen Trennfaktoren die niedrige Ausbeute. Des Weiteren besteht bei größeren Proteinen Denaturierungsgefahr, weshalb man sie zur Trennung dieser selten einsetzt. Bei der Affinitätschromatographie bietet eine HPLC keinen prinzipiellen Vorteil gegenüber der Niederdruckchromatographie, und bei der Trennung von Membranproteinen mit Immunoaffinitätschromatographie oder Chromatofokussierung liefert die Niederdruckchromatographie eher bessere Ergebnisse. Glykoproteine bereiten zusätzlich Schwierigkeiten bei der HPLC (Chicz und Regnier 1990, Aguilar und Hearn 1996).

Bei einer anderen Methode erfolgt die Trennung nach dem Mechanismus der Größenausschlusschromatographie (GPC). Hierbei wird das Molekül nur nach Größeneigenschaften getrennt. Für die erfolgreiche GPC muss die Porengröße des Chromatographiematerials so groß sein, dass der Analyt hineindiffundieren kann. Für große Moleküle ist nur ein Teil der Poren zugänglich; folglich eluieren diese frühzeitig. Kleinen Molekülen ist ein größerer Teil der Poren zugänglich, daher eluieren diese später. Die Parameter, die die Größe des Analyten (z. B. Streckung oder Faltung des Immunoglobulins) beeinflussen, haben somit einen Einfluss auf das Trennergebnis. Maßgeblich sind hier Temperatur und Solvens (pH-Wert, Ionenstärke, Modifier). Große Analyte bzw. Immunoglobuline müssen natürlich in die Poren diffundieren bzw. penetrieren, damit sie nach Größe getrennt werden können. Bei typischen Molmassen von 5 – 150 kDa zeigen Immunoglobuline und deren Begleitstoffe eine erhebliche Trägheit bzw. Viskosität. Dies führt zu einer relativ langsamen Diffusion der Analyte in den Poren des Trennmaterials. Entsprechend gibt es eine starke Abhängigkeit des Trennergebnisses in der GPC von Flussgeschwindigkeit und Temperatur des Eluenten. Die Porengröße des Trennmaterials muss dem Analyten angepasst sein. Maßgeblich sind hier Viskosität (Temperatur und Flussrate) und Porengröße des GPC. Sowohl extreme pH-Werte als auch hohe Temperaturen sind für Denaturierungen von Immunoglobulinen verantwortlich. Obwohl sie häufig angewandt wird, ist die Niederdruck-GPC zum Reinigen von Proteinen, abgesehen von Ausnahmefällen, nicht geeignet, u.a. durch den großen Zeitaufwand beim Säule gießen und fahren, die schlechte Auflösung und das begrenztes Probenvolumen (Stellwagen 1990).

Bei der Reinigung nach Ladungsunterschieden binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix. Die Matrix trägt positiv oder negativ geladene Gruppen. Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins an den Ionenaustauscher hängen von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen der Matrix ab (Choudhary und Horvath 1996).

Bei der hydrophoben Chromatographie macht man sich die hydrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Oberflächen zunutze. Die Assoziationsneigung hängt dabei von der Struktur des Wassers ab und dies von den darin gelösten Salzen (Kennedy 1990, Wu und Karger 1996).

Am geeignetsten erschien uns die Immunoaffinitätschromatographie, eine Methode, die schnell und sicher zu einem sauberen Antigen führt. Sie beruht auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und dem entsprechenden Antigen. Eine gute Affinitätssäule erreicht Reinigungsfaktoren von 1000 und darüber, bei Ausbeuten zwischen 10 und 50%. Speziell mit Hilfe der NHS-Sepharose kann ein Antikörper kovalent mit einer primären Aminogruppe an die Sepharose-Matrix gebunden werden. Die Matrix basiert auf stark quervernetzten Agarose-Kügelchen mit einem „Spacerarm“ bestehend aus 10 Atomen. An der NHS-Sepharose können die Antikörper binden. Die NHS-Sepharose-Antikörper-Bindung zeigt dabei eine erstaunliche pH-Wert-Stabilität in dem Bereich zwischen pH 2-13. Die Antigen-Antikörper-Bindung ist ebenfalls pH-Wert abhängig und hängt von dem jeweiligen Antigen und Antikörper ab. In unseren Experimenten zeigte sich, dass eine besonders hohe Affinität des Antikörpers zum Antigen im physiologischen pH-Wert-Bereich liegt und das BMP-3 bei einem pH Wert von 2,5 eluiert werden kann. Höhere pH-Werte waren weniger geeignet, um eine Elution zu erzielen (Cuatrecasas 1970, Sheikh et al. 1991).

Zu Anfang der Arbeit standen drei kommerzielle Antikörper der Firma Santa-Cruz zur Verfügung, die BMP-3 im Western-Blot detektieren konnten. Einer davon detektierte das BMP-3 am N-terminalen, einer davon am C-terminalen Ende und der letzte im Aminosäuren-Bereich von 363-435. In der Beschreibung der Firma war nur der letzte Antikörper zur Verwendung im Rahmen einer Immunpräzipitation geeignet. Da dieser in unseren Versuchen letztendlich auch das beste Signal im Westernblot zeigte, wurde dieser Antikörper für die weiteren Experimente zur Anreicherung des nativem BMP-3 benutzt. Momentan stehen auch Antikörper von anderen Herstellern zu Verfügung. Ob diese allerdings besser geeignet wären, ist unwahrscheinlich, da das BMP-3-Signal im Blot gut nachvollziehbar war.

In einem NaHCO_3 -Puffer konnte eine stabile NHS-Sepharose-Antikörper-Bindung erreicht werden. Die Funktionalität der Säule wurde überprüft, indem rekombinant hergestelltes BMP-3 (von Arbeitsgruppe Peter Hortschansky zur Verfügung gestellt) über die Säule gegeben wurde. Dieses konnte anschließend bei entsprechender Bindung wieder eluiert werden. Hierbei wurden verschiedene Proteinmengen getestet, um die Säulenkapazität hinsichtlich der Bindung des BMP-3 zu bestimmen. 4 μg BMP-3 kann schätzungsweise von der Säule gebunden werden. Dies hat während der eigentlichen Gewinnung des BMP-3 keine Rolle gespielt, da die

Mengen an BMP-3 im SK-BR-3-konditionierten Überstand so gering waren, dass man den gesamten Überstand zu Elution benutzen musste.

Die verschiedenen uns zur Verfügung stehenden Mammarkarzinom-Zelllinien besaßen unterschiedliche BMP-3-Expressionsmuster. In einer semi-quantitativen PCR wurden drei Zelllinien untersucht, von denen SK-BR-3 die höchste Expression an BMP-3 besaß. Deshalb entschieden wir uns, diese Zelllinie zur weiteren Aufreinigung des BMP-3 zu benutzen. Was hier kritisch angemerkt werden muss, ist, dass die hohe Expression auf mRNA-Ebene nicht auf Proteinebene in den Folgeexperimenten gesehen wurde. Somit kann nicht mit letzter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die SK-BR-3-Zellen auch die größten Mengen an BMP-3-Protein exprimierten. Posttranslationale Mechanismen können auch dort noch regulierend eingegriffen haben.

Von BMP-3 gibt es bisher keine veröffentlichten Untersuchungen zur Biosynthese. Man kann aber davon ausgehen, dass diese der von BMP-2 ähnlich ist. Vom BMP-2-Protein sind die Syntheseschritte gut bekannt. So kann man verschiedene Formen bei der Produktion in CHO-Zellen detektieren, zum einen ein amino-terminales Propeptid von 40-45 kDa, zum zweiten ein matures bioaktives 30 kDa Homodimer aus zwei Untereinheiten bestehend aus 18-22 kDa und einem kleinen Anteil von ungespaltenem 60 kDa Vorläuferprotein. Die molare Menge von sezerniertem, prozessiertem Propeptid ist hier ca. fünfmal so hoch wie für matures BMP-2 in konditioniertem Medium. BMP-2 assoziiert mit der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche der CHO-Zellen, was die ungleiche Verteilung von extrazellulärem Propeptid und der maturen Form im konditioniertem Medium erklären könnte (Israel et al. 1992).

Die Überprüfung unserer Proteinexpression erfolgte mittels des vorher ausgewählten BMP-3-Antikörpers und einer entsprechenden Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Proteinlysate und der Überstand benutzt. Sowohl im Proteinlysate als auch im Überstand korrelierte keine der Banden mit dem rekombinant hergestellten BMP-3. Es fällt allerdings eine Bande bei ca. 30 kDa auf, die dem reifen „BMP-3 lang“ in glykosylierter Form entsprechen könnte. Die Daten über das Molekulargewicht stimmen mit denen von anderen Arbeitsgruppen überein.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen sind widersprüchliche experimentelle Ergebnisse bezüglich der Größe des reifen Proteins publiziert worden. Versuche mit aufgereinigtem Osteogenin aus Rinderknochen ergaben in der reduzierenden SDS-

Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 22 kDa. Das aufgereinigte Protein ist in der Lage, Knorpel und Knochenbildung zu induzieren (Luyten et al. 1992). Die Arbeitsgruppe um Aaron Daluiski hingegen zeigte das rekombinante BMP-3 bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, je nach Glykosylierungszustand des BMP-3. Das rekombinante BMP-3 von pBABE Zellen hat ein Molekulargewicht von 28,6 kDa, und das Molekulargewicht von retroviralem BMP-3 ist sogar noch größer und liegt bei ca. 33 kDa durch die hier vorhandenen Glykosylierungen (Katagiri et al. 1994). Das in E.coli hergestellte rekombinante humane BMP-3 aus der Arbeitsgruppe von Peter Hortschansky besitzt ein anderes Molekulargewicht. Die Ursache liegt in den unterschiedlichen proteolytischen Schnittpunkten des BMP-3, daraus resultiert auch die kurze und eine lange Variante des maturen BMP-3. Das native BMP-3 aus unseren Elutionsexperimenten wurde Deglykosylierungsexperimenten unterzogen, um ein besseres Verständnis für das Molekulargewicht von 30 kDa zu erhalten. BMP-3 besitzt 4 potentielle Glykosylierungsstellen, die N-glykosidische Bindung erlauben. Das Protein mit der Endoglykosidase-H zu deglykosylieren, brachte keinen sichtbaren Unterschied in Bezug auf die Bandenstärke. Eine andere Möglichkeit, die die Bande in dem Bereich bei 30 kDa erklären könnte, wäre die Fähigkeit der BMPs zur Homodimerbildung. Diese müssten während des Prozesses der Denaturierung in Vorbereitung für den Gellauf aber mit den benutzten Materialien, insbesondere Mercaptoethanol, zerstört worden sein, sodass keine Homodimere mehr vorliegen sollten. Auch zusätzlich eingebrachte Agenzien wie DTT und SDS änderten nichts an den nachgewiesenen Proteingrößen. Der unprozessierte Vorläufer von BMP-3 hat ein Molekulargewicht von ca. 53,4 kDa und war in den angefertigten Blots gut detektierbar. Mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie erhielten wir das gewünschte native BMP-3. Die Gewinnung ist aber sehr abhängig vom Antikörper. Der Antikörper, der im Rahmen unserer Experimente verwendet wurde, war hinsichtlich der verschiedenen Herstellungschargen aufgrund seiner Polyklonalität nicht einheitlich, so dass verschiedene Epitope des BMP-3 mit unterschiedlicher Affinität erkannt wurden. So wurde das unreife BMP-3 z.T. genauso gut erkannt wie das reife BMP-3 und beeinträchtigte somit die Effizienz der Säule und der Protein-A-Sepharose während der Immunopräzipitation.

Eine weitere Schwäche der Methode ist, dass die Elution des gebundenen BMP-3 bei einem relativ niedrigen pH-Wert stattfinden musste. Es wurde zwar in einem

entsprechenden Puffer aufgefangen, trotzdem sind im Rahmen der Elution des BMP-3 Verluste an biologischer Aktivität nicht auszuschließen. Verluste an Aktivität des gewonnenen BMP-3 sind auch durch Restbindung gelöster Antikörper von der Säule durch die Elution einzukalkulieren.

Die Funktion des BMP-3 wird bisher indirekt über die Möglichkeit der Regulation bzw. Inhibition der anderen BMPs definiert. Somit ist es nötig, eine biologische Funktion mit Hilfe von anderen BMPs darzustellen. Es stehen verschiedene Modelle zur Verfügung, die biologische Funktion von BMP-3 als Antagonist zu erklären. Für die ventralisierenden Effekte von BMP-4 und Activin in der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs konnte gezeigt werden, dass diese in Kombination mit BMP-3 aufgehoben werden. Dies geschieht über die Bindung und dortige Inhibition am ActR-II-Rezeptor (Gamer et al. 2005). Dies konnte auch für BMP-2 gezeigt werden und wurde in diesem Rahmen mit der Möglichkeit der Heterodimerbildung in Zusammenhang gebracht (Hino et al. 2003). BMP-3 kann als Antagonist auch die durch BMP-2 initiierte Induktion der Differenzierung von Osteoprogenitor-Zellen in Osteoblasten hemmen (Daluiski et al. 2001).

Von BMP-2 ist bekannt, dass es die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten fördert. Dies geschieht über eine Aktivierung des ALK-1 Rezeptors. Des Weiteren ist in diesem Rahmen eine Induktion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität zu verzeichnen (Thies et al. 1992, Katagiri et al. 1994, Engstrand et al. 2000). Die BMP induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase wird oft zum Nachweis für die BMP-induzierte Osteoblastendifferenzierung benutzt (Fujii et al. 1999).

So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bioassay im Mikrotiterplattenformat eingesetzt, um den Einfluss von BMP-3 auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität zu bestimmen. In unseren Experimenten wurde BMP-3 auf verschiedene Weise gewonnen, zum einem über die Säule, über Protein-A-Sepharose und durch unbehandeltes SK-BR-3-konditioniertes Medium. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde durch rekombinantes BMP-2 induziert und beobachtet, welche Effekte in Kombination mit dem gewonnenen BMP-3 zu verzeichnen sind. In allen Experimenten ließ sich ein hemmender Effekt des gewonnen BMP-3 auf das BMP-2 nachweisen. Deutlicher zeigt sich der Effekt beim Vergleich der Proben vor und nach Elution von BMP-3. Eine schwächere Induktion der ALP durch BMP-2 ist vor dem Eluieren von BMP-3 zu sehen, eine stärkere Induktion der ALP durch BMP-2 in

Abwesenheit von BMP-3 und seiner hemmenden Wirkung. Die unterschiedliche Induktion der Alkalischen Phosphatase ist in diesem Assay in der Kinetik besser ausgeprägt.

Der genaue Mechanismus des hemmenden Einflusses von BMP-3 ist unbekannt. Man vermutet, dass die Effekte über die bekannte Aktivierung des TGF- β /Activin-Signalweges durch BMP-3 ausgeübt werden könnten. Activin kann BMP-Signalwege durch mindestens zwei verschiedene Mechanismen antagonisieren. Sowohl Activin als auch BMPs benutzen das Downstreamelement Smad-4 als Teil ihrer spezifischen Signaltransduktionskaskade. Die Konkurrenz um den begrenzten Pool von Smad-4, der in der Zelle vorherrscht, limitiert das Signal nach außen. Der Activin-Signalweg teilt sich ebenso einige Typ-II-Rezeptoren mit dem BMP-Signalweg. Beispielsweise kann der ActR-IIB-Rezeptor verschiedene BMPs und auch Activin binden. Abhängig vom Typ-I-Rezeptor, der zu dem Komplex entweder durch Activin oder BMP-Liganden hinzugefügt wird, können diese Typ-II-Rezeptoren entweder eine Activin oder BMP-Antwort übermitteln. Auf diese Weise führt das Activin-Signal zum Hinzukommen von ActR-IIA zu dem Activin-abhängigen Rezeptorkomplex, wodurch die freien Level von ActR-IIA, die für die Bildung von BMP-Rezeptorsignalkomplexen vorhanden sind, reduziert werden. Übereinstimmend mit dieser Sichtweise kann der Antagonismus zwischen Activin und BMP-7 überwunden werden durch Überexpression von ActR-II. ActR-II-defiziente Mäuse haben eine niedrige Schwelle für skelettale Dismorphien und Gesichtsabnormalitäten, welche sich von den Defekten, die man in Mäusen ohne den Activin-Liganden sieht, unterscheiden. Dies impliziert, dass ein anderer Ligand, wahrscheinlich ein BMP, über den ActR-II-Rezeptor funktioniert, um diese Strukturen auszubilden. Der zweite Activin-Typ-II-Rezeptor, ActR-IIB, ist für das korrekte Muster der Wirbel durch die Hox-Gene verantwortlich. Dieses Entwicklungsmuster könnte aufgrund von BMP-Signalwegen über den Signalweg über ActR-II funktionieren, welches dann die Expression der Hox-Gene aktiviert. Potentielle Unterschiede in der Knochendichte wurden für diese mutierten Stränge bisher nicht berichtet. Die Konkurrenz zwischen Activin- und BMP-Signalwegen, entweder auf dem Level der Rezeptoren oder bei der Herunterregulierung des Smad-4, spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochendichte. Osteogene BMPs wie BMP-2 oder -7 sind äußerst potent und können die Differenzierung von mesenchymalen Zellen über den osteogenen Signalweg bedingen. Aus diesem Grund könnte die Anwesenheit von

BMP-3 die Ansammlung von osteogenen BMPs ermöglichen, welche dann für neue Knochenbildung während einer normalen Phase vom Knochenaufbau oder Frakturheilung bzw. beidem genutzt werden könnte, während man gleichzeitig unangemessene BMP-Aktivität in vivo verhindern kann. Deshalb kann man annehmen, dass TGF- β /Activin- und BMP-Signalwege in antagonistischer Beziehung stehen, was sowohl die Knochenformation als auch das „Remodelling“ und synergistische Beziehung auf der anderen Seite angeht. Die Zelltypen, die für den Phänotyp von BMP-3 $-/-$ Mäusen verantwortlich sind, sind derzeit noch nicht bekannt. Unterschiede bei Osteoklasten- oder Osteoblastenzahl wurden bislang nicht beobachtet. Die Anreicherung von Mineralien, die durch Fluor/Chrom-Markierung gemessen wurde, war ähnlich bei Mutanten und Wildtypmäusen. Obwohl die TRAP-Färbung keine relevanten Unterschiede in der Osteoklastenanzahl zeigte, weiß man nicht, ob die Funktion dieser nicht beeinträchtigt ist. Sehr subtile Defekte des Knochenturnovers könnten unter Versuchsbedingungen nicht nachvollziehbar sein. Sie könnten jedoch in kumulativer Wirkung zu der verstärkten Knochendichte führen, die in mutanten Mäusen beobachtet werden konnte. Dies korreliert gut mit der Beobachtung von Mäusen, die einen Osteoblasten spezifischen dominant negativen Rezeptor exprimieren. Diese Mäuse erleben einen altersabhängigen Zuwachs an trabekulärer Knochenmasse, während die Rate der osteoblastischen Knochenbildung unverändert bleibt. Demnach führt in Mäusen mit dieser Mutation die Beeinträchtigung des Signalweges über TGF- β /Activin zu einer erhöhten Knochendichte. Der Phänotyp dieser BMP-3 $-/-$ Mäusen ist gut vereinbar mit der Rolle von BMP-3 als Aktivator des TGF- β /Activin-Signalweges in vivo. Diese Überlegung wird unterstützt durch die Tatsache, dass BMP-3 in osteoblastischen Zelllinien ein TGF-Activin-abhängiges genetisches Element aktivieren kann. Obwohl BMP-3 selbst als therapeutisches Mittel wahrscheinlich nur von geringem Wert ist, implizieren diese Vermutungen, dass eine veränderte Signalantwort durch BMP-3 oder Activin die Potenz des BMP-Signalweges verstärkt. Dieses könnte die Wirksamkeit von rekombinant oder retroviral hergestelltem BMP erhöhen, was eine effizientere Knochenbildung (induziert mit niedrigen BMP-2-Dosen) zur Folge haben könnte. Wir benötigen ein tiefgreifenderes Verständnis der Rollen von BMP-3 und Activin und ihren zellulären Zielmolekülen in vivo, um festzustellen, ob oben beschriebener Ansatz therapeutisch nutzbar sein könnte.

5.0. Literaturverzeichnis

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. 2002. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*, 4 (8):599-604.

Aguilar MI, Hearn MT. 1996. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods Enzymol*, 270:3-26.

Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. 1993. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol*, 12 (10):871-880.

Arnold SF, Tims E, McGrath BE. 1999. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP-2. *Cytokine*, 11 (12):1031-1037.

Attisano L, Wrana JL. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol*, 12 (2):235-243.

Bahamonde ME, Lyons KM. 2001. BMP-3: to be or not to be a BMP. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1 (Pt 1):S56-62.

Beral DV, Peto R, G. R. 2001. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358 (9291):1389-1399.

Chicz RM, Regnier FE. 1990. High-performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes. *Methods Enzymol*, 182:392-421.

Choudhary G, Horvath C. 1996. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol*, 270:47-82.

Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (5):271-279.

Constam DB, Robertson EJ. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol*, 144 (1):139-149.

Correia JJ, Chacko BM, Lam SS, Lin K. 2001. Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad-3:Smad-4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry*, 40 (5):1473-1482.

Cuatrecasas P. 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J Biol Chem*, 245 (12):3059-3065.

Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. 2001. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*, 27 (1):84-88.

Degen WG, Weterman MA, van Groningen JJ, Cornelissen IM, Lemmers JP, Agterbos MA, Geurts van Kessel A, Swart GW, Bloemers HP. 1996. Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer*, 65 (4):460-465.

Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. 1998. Direct binding of Smad-3 and Smad-4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J*, 17 (11):3091-3100.

Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95 (6):737-740.

Deutschland ABKi. 2002. Krebs in Deutschland Saarbrücken: Braun Druck, Riegelsberg.

Doctor JS, Jackson PD, Rashka KE, Visalli M, Hoffmann FM. 1992. Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 151 (2):491-505.

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad-7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, 276 (16):12477-12480.

Engstrand T, Daluiski A, Bahamonde ME, Melhus H, Lyons KM. 2000. Transient production of bone morphogenetic protein 2 by allogeneic transplanted transduced cells induces bone formation. *Hum Gene Ther*, 11 (1):205-211.

Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J, Gitelman SE, Lotz J, Heilman M, Derynck R. 1999. Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development*, 126 (19):4267-4279.

Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K. 1999. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*, 10 (11):3801-3813.

Gamer LW, Nove J, Levin M, Rosen V. 2005. BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 285 (1):156-168.

George P. Allendorph, Michael J. Isaacs, Yasuhiko Kawakami, Juan Carlos Izpisua, Belmonte, and Senyon Choe 2007. BMP-3 and BMP-6 Structures Illuminate the Nature of Binding Specificity with Receptors. *Biochemistry*, 46 (43), 12238 -12247

Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. 2004. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer*, 101 (1):51-57.

Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural

paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (2):878-883.

Group ABCS. 2000. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer*, 83 (10):1301-1308.

Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells *Prostate*. 1994 Apr;24(4):204-11.

Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y. 1999. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline $\text{C}\alpha$ promoter. *J Biol Chem*, 274 (44):31577-31582.

Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. 2000. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*, 100 (2):229-240.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659):465-471.

Hino J, Kangawa K, Matsuo H, Nohno T, Nishimatsu S. 2004. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front Biosci*, 9:1520-1529.

Hino J, Nishimatsu S, Nagai T, Matsuo H, Kangawa K, Nohno T. 2003. Coordination of BMP-3b and cerberus is required for head formation of *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 260 (1):138-157.

Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, 6 (4):432-438.

Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. 1999. Id genes are

direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 274 (28):19838-19845.

Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. 1998. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*, 1 (5):673-683.

Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N. 1998. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (16):9337-9342.

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. 1997. Smad-6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, 389 (6651):622-626.

Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, ten Dijke P, Sugino H, Nishihara T. 1999. Differential inhibition of Smad-6 and Smad-7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem*, 274 (19):13637-13642.

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. 1992. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*, 7 (2):139-150.

Jonk LJ, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P, Kruijer W. 1998. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem*, 273 (33):21145-21152.

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 1):1755-1766.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. 2000. Smad-7 binds to Smurf-2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, 6 (6):1365-1375.

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9 (1):49-61.

Kennedy RM. 1990. Hydrophobic chromatography. *Methods Enzymol*, 182:339-343.

Kimura J, Sato-Maeda M, Noji S, Ide H. 2000. Synergistic effects of FGF and non-ridge ectoderm on gene expression involved in the formation of the anteroposterior axis of the chick limb bud in cell culture. *Dev Growth Differ*, 42 (3):219-227.

Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. 1997. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev*, 11 (8):984-995.

Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. 1997. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res*, 232 (2):263-269.

Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. 2003. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis*, 24 (9):1445-1454.

Li B, Boast S, de los Santos K, Schieren I, Quiroz M, Teitelbaum SL, Tondravi MM, Goff SP. 2000. Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat Genet*, 24 (3):304-308.

Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*, 68 (4):775-785.

Lo RS, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massague J. 1998. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *Embo J*, 17 (4):996-1005.

Luyten FP, Yu YM, Yanagishita M, Vukicevic S, Hammonds RG, Reddi AH. 1992. Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem*, 267 (6):3691-3695.

Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH. 1989. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, 264 (23):13377-13380.

Maliakal JC, Asahina I, Hauschka PV, Sampath TK. 1994. Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors*, 11 (3):227-234.

Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791.

Massague J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J*, 19 (8):1745-1754.

McDonald NQ, Hendrickson WA. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 73 (3):421-424.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 321 (7261):624-628.

Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol*, 75:115-157.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187 (3):265-276.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114 (Pt 24):4359-4369.

Murray-Rust J, McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA. 1993. Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure*, 1 (2):153-159.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad-2, Smad-3 and Smad-4. *Embo J*, 16 (17):5353-5362.

Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K. 1996. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem*, 271 (35):21345-21352.

Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, De Robertis EM. 2000. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, 405 (6788):757-763.

Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401 (6752):480-485.

Osada S, Ohmori SY, Taira M. 2003. XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development*, 130 (9):1783-1794.

Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H. 1991. Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 179 (1):116-123.

Padgett RW, St Johnston RD, Gelbart WM. 1987. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature*, 325 (6099):81-84.

Pardali E, Xie XQ, Tsapogas P, Itoh S, Arvanitidis K, Heldin CH, ten Dijke P, Grundstrom T, Sideras P. 2000. Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem*, 275 (5):3552-3560.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49 (1):33-64, 31.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. 1996. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, 86 (4):589-598.

Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. 2000. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad-4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol*, 20 (23):9041-9054.

Pouponnot C, Jayaraman L, Massague J. 1998. Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem*, 273 (36):22865-22868.

Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE, Hoffken K. 1999. Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 83 (1):38-44.

Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131 (11):741-750.

Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, Tucker RF, Hoffmann FM. 1993. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (13):6004-6008.

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, et al. 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem*, 267 (28):20352-20362.

Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 287 (1):103-115.

Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139 (3):1347-1358.

Serra S, Morgante L. 1980. [Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. I. General characteristics and comparative analysis with the biuret method and Lowry's method]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 56 (2):160-165.

Sheikh SP, Hansen AP, Williams JA. 1991. Solubilization and affinity purification of the Y2 receptor for neuropeptide Y and peptide YY from rabbit kidney. *J Biol Chem*, 266 (35):23959-23966.

Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X. 1999. Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem*, 274 (19):13711-13717.

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, 94 (5):585-594.

Stellwagen E. 1990. Gel filtration. *Methods Enzymol*, 182:317-328.

Takao M, Hino J, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H, Kangawa K. 1996. Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 219 (2):656-662.

Tamaki K, Souchelnytskyi S, Itoh S, Nakao A, Sampath K, Heldin CH, ten Dijke P. 1998. Intracellular signaling of osteogenic protein-1 through Smad-5 activation. *J Cell Physiol*, 177 (2):355-363.

ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem*, 269 (25):16985-16988.

Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. 1992. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*, 130 (3):1318-1324.

Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150 (698):893-899.

Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. 1999. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem*, 274 (29):20489-20498.

Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. 1988. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (24):9484-9488.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (6):2220-2224.

Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E. 2000. Regulation of intracellular

dynamics of Smad-4 by its leucine-rich nuclear export signal. EMBO Rep, 1 (2):176-182.

Whitman M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. Genes Dev, 12 (16):2445-2462.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM,

Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science, 242 (4885):1528-1534.

Wu SL, Karger BL. 1996. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. Methods Enzymol, 270:27-47.

Xiao Z, Liu X, Lodish HF. 2000a. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. J Biol Chem, 275 (31):23425-23428.

Xiao Z, Liu X, Henis YI, Lodish HF. 2000b. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. Proc Natl Acad Sci U S A, 97 (14):7853-7858.

Xiao Z, Brownawell AM, Macara IG, Lodish HF. 2003. A novel nuclear export signal in Smad1 is essential for its signaling activity. J Biol Chem, 278 (36):34245-34252.

Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. Science, 270 (5244):2008-2011.

Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. 1999. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. Embo J, 18 (1):179-187.

Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse RV, 2nd, Tabin CJ. 1999. Antagonistic signaling by

Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell*, 98 (5):573-583.

Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T. 2000. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, 103 (7):1085-1097.

Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. 1998. Human Smad-3 and Smad-4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell*, 1, (4):611-617.

Zhu B, Pu Q, Chen N, Chen S. 1999a. Expression, purification, and bone-inducing activity of recombinant human bone morphogenetic protein-3 mature peptide. *Chin J Biotechnol*, 15 (3):153-158.

Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. 1999b. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400 (6745):687-693.

6.0. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1. Inzidenz des Mammakarzinoms weltweit
- Abb. 1.2. Aufbau der Proteine der TGF- β -Superfamilie
- Abb. 1.3. Einteilung der TGF- β -Superfamilie
- Abb. 1.4. Sekundärstruktur von BMP-2
- Abb. 1.5. Swiss Model Repository von BMP-3
- Abb. 1.6. Struktur der Smads
- Abb. 1.7. Signalkaskade der BMPs
- Abb. 1.8. Assoziierte Krankheiten mit TGF- β und BMP-Familie
- Abb. 2.1. Milliporekatalog Filtereinheit
- Abb. 2.2. Einzelne Schritte der Immunoaffinitätschromatographie mit NHS-Sepharose
- Abb. 2.3. Aufbau Blot-Sandwich
- Abb. 2.4. Ablauf Polymerase-Kettenreaktion
- Abb. 3.1. Expression von BMP-3 in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien
- Abb. 3.2. Test der drei verfügbaren BMP-3-Antikörper von Santa Cruz
- Abb. 3.3. BMP-3-Expression in Zellkulturüberstand und Zelllysat
- Abb. 3.4. Schematische Darstellung der Immunoaffinitätschromatographie
- Abb. 3.5. Antikörperwaschschritte 1-8
- Abb. 3.6. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 2 μ g
- Abb. 3.7. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 2 μ g
- Abb. 3.8. Säulentest mit rekombinantem BMP-3 mit jeweils 20 μ g
- Abb. 3.9. Wachstumsverhalten der SK-BR-3-Zellen
- Abb. 3.10. Proteinlysat der serumfreien SK-BR-3-Zellen
- Abb. 3.11. Einzelne Schritte der Säule im Dot-Blot getestet
- Abb. 3.12. Ermittlung, in welchen Fraktionen beim Kulturüberstandmedium das BMP-3 zu finden ist
- Abb. 3.13. Eluat aus 48 Stunden-serumfreiem SK-BR-3-Kulturmediumüberstand
- Abb. 3.14. Deglykosylierung des nativen BMP-3
- Abb. 3.15. Auftrag Proben aus Millipore-Aufreinigung
- Abb. 3.16. Isolierung BMP-3 mit Protein-A-Sepharose
- Abb. 3.17. Inkubation von C2C12-Zellen mit 48 Stunden-konditioniertem SK-BR-3-Medium, Endpunkt 15 min

Abb. 3.18. Inkubation mit rekombinantem glykosylierten BMP-2 und dem gewonnenen Eluat, Medium jeweils vor und nach dem Eluieren

Abb. 3.19. Inkubation von C2C12-Zellen mit rekombinantem BMP-2, konditioniertem Medium von SK-BR-3 48 h und aus Protein-A-Sepharose gewonnenen BMP-3

7.0. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.	Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie bei Säugetieren
Tab. 2.1.	Zellkultivierung
Tab. 2.2.	Säulenmaterial
Tab. 2.3.	Material zur Bearbeitung des Kultur-Überstandes
Tab. 2.4.	Protein-A-Sepharose
Tab. 2.5.	Material für die Deglykosylierung
Tab. 2.6.	Proteinisolierung
Tab. 2.7.	Konzentrationsbestimmung
Tab. 2.8.	Material für die Gelelektrophorese
Tab. 2.9.	Material für Western Blot
Tab. 2.10.	Material für den immunologischen Nachweis von Proteinen
Tab. 2.11.	Material für den Plattenansatz
Tab. 2.12.	Material für die Messung der Aktivität der ALP
Tab. 2.13.	Material zu Isolierung der RNA
Tab. 2.14.	Material zur cDNA Synthese
Tab. 2.15.	CR-Ansatz
Tab. 2.16.	Materialien Agarose-Gel

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Clement und Prof. Dr. Stefan Wölfl für die fachliche Betreuung, die Geduld und die fachlichen Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des Labors, ganz besonders Conny, Anja und Dana, in Jena danke ich für Ihre gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Freunden, speziell meiner Freundin Anja für die moralische Unterstützung.

Meiner Familie danke für ich für so vieles.

Persönliche Daten

Geburtsdatum und –ort	15.05.1978 in Cottbus
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1984 -1991	POS Erich Weinert, Erfurt
1991- 1996	Abitur an der KGS (Kooperative Gesamtschule) am Schwemmbach, Erfurt, Note: 1,7

Studium

10/ 1997- 05/ 2004	Studium der Humanmedizin, Jena
10/ 1998- 05/ 2004	Zertifikatsstudium der Wirtschaftswissenschaften, Jena
05/ 2004	3. Staatsexamen (Note 2,00; Gesamtnote 2,3)

Praktische Tätigkeiten

08/ 2001	Famulatur auf der chirurgischen und gynäkologischen Station in Puebla, Mexico
02/ 2002	Famulatur auf der onkologischen Station, Jena
Seit 05/ 2002	Studentische Hilfskraft beim ASB im ärztlichen Notdienst, Erfurt
04/ 2003- 04/ 2004	Praktisches Jahr
seit 2005	Assistenzarzt in der Hämato-/Onkologie am Universitätsklinikum Freiburg

Tätigkeiten neben dem Studium

10/ 2000	Gründungsmitglied der EMSA (European Medical Students Association) in Jena
2001- 2003	Mitglied im Finanzausschuss des Senats der FSU Jena
05/ 2001- 06/ 2002	Vorstandsvorsitzender der EMSA- Deutschland (European Medical Student's Association)

Wissenschaftliche Tätigkeit

03/ 2002	Posterpräsentation über das Thema „Isolierung von nativem BMP-3, einem möglichen Inhibitor von BMP-2, aus der Mammakarzinom Zelllinie SK-BR-3“ beim Deutschen Krebskongreß in Berlin
11/ 2005	Posterpräsentation DGHO "Light chain breakthrough MM"
06/ 2006	Primary (AL) amyloidosis in plasma cell disorders; Müller AM, Geibel A, Neumann HP, Kühnemund A, Schmitt-Gräff A, Böhm J, Engelhardt M.
03/2006	Efficacy of diverse high-dose regimens followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation in consecutive multiple myeloma patients: a single-centre analysis over a 12-year period. Haas PS, Bauchmüller K, Kühnemund A, Finke J, Ihorst G, Engelhardt M.
seit 01/05	Betreuung klinischer Studien (CML IV, BUM I und IV, Nilotinib-Studie)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst geschrieben habe und alle von mir benutzen Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Joachim Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Freiburg, den 15.04.08

Alexander Kühnemund

